

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS

Dpto. Biología Molecular

**Nuevo papel de FAS en el control de la proliferación de las
células T activadas : Implicaciones para la homeostasis
inmunológica y el desarrollo de autoinmunidad**

André Ballesteros Tato

El trabajo presentado en esta memoria ha sido realizado en el Departamento de Inmunología y Oncología del centro Nacional de Biotecnología, bajo la dirección del Dr. Dimitrios Balomenos

A mi Madre

ÍNDICE

	<u>Pág.</u>
I-ABREVIATURAS.....	1
II-SUMMARY.....	3
III-INTRODUCCIÓN	
1.Conceptos básicos sobre el Sistema Inmunológico y la Inmunidad mediada por Células T.....	7
1.1 Componentes del Sistema Inmunológico.....	7
1.2 Mecánica de la respuesta de las células T.....	7
1.2.1 Activación de las células T por antígenos extraños.....	7
1.2.2 Dinámica de respuesta de las Células T.....	8
1.3 Tolerancia y autoinmunidad.....	9
1.3.1 Tolerancia Central.....	10
1.3.2 Tolerancia Periférica.....	10
2. Sistema apoptótico FAS/FAS-L.....	13
2.1 FAS.....	13
2.2 FAS-L.....	14
2.3 Mecanismo molecular de inducción de apoptosis mediada por FAS.....	14
2.3.1 Formación del DISC.....	16
2.3.2 Ruta de amplificación mitocondrial.....	17
2.3.3 FLIP.....	17
3.Patología autoinmune asociada a defectos en la ruta de FAS: Síndrome Autoinmune Linfoproliferativo.....	18
3.1. Síndrome Autoinmune Linfoproliferativo.....	18
3.1.1 Síndrome Autoinmune Linfoproliferativo: Diagnóstico molecular.....	18
3.2 Modelos animales con defectos en la expresión o funcionalidad de FAS o FAS-L.....	19
3.2.1 Cepa <i>lpr</i>.....	19
3.2.2 Cepa <i>gld</i>.....	20
3.2.3 Cepa <i>lpr^{fg}</i>.....	20
4. Consecuencias inmunológicas del defecto en la expresión o funcionalidad de FADD y Caspasa-8.....	20
4.1 Defectos en la proliferación de las células T asociados a defectos en FADD.....	21

4.2 Defectos en la proliferación de las células T asociados a defectos en la activación o expresión de caspasas.....	22
4.2.1 Requerimiento de la actividad caspasa en la proliferación y activación de las células T.....	22
4.2.2 La Caspasa-8 es esencial para la activación TCR-dependiente de NF-κB	23
5. Papel del Ciclo Celular en inducción de Tolerancia Periférica.....	25
5.1 El Ciclo Celular.....	25
5.2 El control del Ciclo Celular es fundamental para el establecimiento de Tolerancia Periférica.....	26
IV.OBJETIVOS.....	29
V.MATERIAL Y MÉTODOS	
1. Materiales biológicos.....	35
1.1 Ratones.....	35
1.2 Pacientes.....	35
2. Preparaciones celulares.....	36
2.1 Obtención de células T de ratón.....	36
2.2 Obtención de células T Humanas.....	36
3 Cultivos celulares.....	37
3.1 Medios de cultivo.....	37
3.2 Cultivo de células T de ratón.....	37
3.2.1 Protocolo largo de estimulación repetida.....	37
3.2.2 Protocolo corto de estimulación repetida.....	38
3.3 Cultivos de células T humanas.....	38
4. Ensayos de proliferación y Tinción de ciclo celular.....	39
4.1 Ensayos de proliferación <i>in vitro</i>	39
4.1.1 Incorporación de Timidina Triteriada.....	39
4.1.2 Marcaje con CFSE.....	39
4.1.3 Cultivos mixtos de células T <i>lpr</i> y <i>gld</i>	39
4.2 Ensayos de proliferación <i>in vivo</i>	40
4.3 Tinción de ciclo celular.....	40
5. Citometría de flujo.....	41
6. Ensayos Bioquímicos.....	42
6.1 Western Blot.....	42

6.2 Medida de actividad quinasas CDK2.....	43
6.2.1 Inmunoprecipitación de CDK2.....	43
6.2.2 Ensayo Quinasa para CDK2.....	44
6.3 EMSA.....	44
6.4 Medida de longitud telomérica.....	45
6.5 Medida de actividad Telomerasa.....	46
6.5.1 Obtención de extractos S-100.....	46
6.5.2 Ensayo de actividad Telomerasa.....	46
6.6 Medida de actividad caspasa.....	47
7. Análisis Serológicos e Histológicos.....	47
7.1 Detección de anticuerpos anti-DNA en suero.....	47
7.2 Inmunofluorescencia en criocortes de riñón.....	47
7.3 Evaluación de Glomerulonefritis.....	48
7.4 Cuantificación del nivel de proteína en orina.....	48
8. Estadística.....	48

VI. RESULTADOS

1. Breve introducción a la enfermedad autoinmune asociada al fenotipo

<i>lpr</i>	51
1.1 Hiperplasia de los órganos linfoides secundarios en los ratones <i>lpr</i>	52
1.1.1 Acumulación de células T Doble Negativas y células T CD4 ⁺ de memoria en los órganos linfoides secundarios de los ratones <i>lpr</i>	53
1.1.2 Acumulación de células B IgG ^{alto} en los ganglios linfáticos de los ratones <i>lpr</i>	53
1.2 La hiperactivación del Sistema Inmunológico en los ratones <i>lpr</i> da lugar al desarrollo de autoinmunidad.....	54
2. Estudio de las características proliferativas de las células T deficientes en FAS.....	56
2.1 Hiperproliferación de las células T deficientes en FAS tras activación repetida <i>in vitro</i>	56
2.2 FAS controla de forma directa la proliferación y expansión de las células T activadas que sobreviven a la inducción de apoptosis.....	59
2.3 Hiperproliferación <i>in vivo</i> de las células T deficientes en FAS.....	63
2.4 La inhibición de la proliferación es dependiente de FAS y requiere la interacción con FAS-L.....	64

2.5 Implicación del Dominio de Muerte en la inhibición de la proliferación: un modelo animal para el estudio del Síndrome Autoinmune Linfoproliferativo Tipo Ia.....	67
2.6 Hiperproliferación de las células T procedentes de pacientes del Síndrome Autoinmune Linfoproliferativo Tipo Ia.....	69
2.7 Altos niveles de actividad Telomerasa en las células T <i>lpr</i>	71
3. Consecuencias de la señalización mediada por FAS en la activación TCR-dependiente de la célula T.....	72
3.1 La actividad caspasa es requerida para la proliferación secundaria. Papel de FAS como regulador negativo de la proliferación dependiente de caspasas.....	73
3.2 FAS regula negativamente la activación de NF- κ B en células T activadas resistentes a apoptosis.....	74
3.3 FAS regula negativamente la activación de ERK-1/2 en células T activadas resistentes a apoptosis.....	78
4. Papel de FAS en el control del Ciclo Celular.....	80
5. Inhibición del fenotipo autoinmune de los ratones <i>lpr</i> mediante el control de la proliferación de las células T	85
 VII.DISCUSIÓN	
1. FAS controla la proliferación de las células T activadas repetidamente...	93
2. Papel de FAS como regulador negativo de la activación de caspasas dependiente del TCR: consecuencias en la activación de las células T.....	96
2.1 Efecto de FAS en el control de la activación de NF- κ B y ERK-1/2 tras la activación secundaria	97
2.2. Papel de la Caspasa-8 en la sobre-proliferación de las células T deficientes en FAS.....	98
2.3 Modelo teórico de regulación negativa de la activación por FAS.....	99
2.3.1 Modelo de activación de la procaspasa-8 tras la estimulación secundaria en células T.....	100
2.4 Efecto de la señalización por FAS en el control de la regulación del ciclo celular: papel de p21 en el control de la proliferación de las células T <i>lpr</i>	103

3. Papel de FAS en la regulación de la respuesta de las células T ante antígenos endógenos: implicaciones para el desarrollo de autoinmunidad.....	104
3.1 El control de la proliferación de las células T lpr <i>in vivo</i> es un factor fundamental en el establecimiento de Tolerancia Periférica.....	108
4. Nuevo punto de vista para el diseño de aplicaciones terapéuticas en pacientes con defectos en la expresión de FAS: implicación de la falta de FAS en el desarrollo de linfomas.....	109
5. Conclusión final.....	110
 VIII. CONCLUSIONES.....	113
 IX. BIBLIOGRAFÍA.....	117
 X. ANEXOS.....	131

ABREVIATURAS

AICD	del inglés, Muerte Celular Inducida por Activación.
ALPS	del inglés, Síndrome Autoinmune Linfoproliferativo
APC	del inglés, Alofococianina
BrdU	5-bromo-2'deoxiuridina
BCR	del inglés, Receptor de Antígeno de la Célula B
C-8	Caspasa-8
CBM	Complejo formado por CARMA-1, BCL-10 y MALT-1
c-FLIP	en inglés, <i>Cellular FLIP</i>
CDK	del inglés, Quinasa Dependiente de Ciclina
CFSE	en inglés, 5-6-carboxyfluorescein diacetate succinidyl ester
Con A	Concanavalina A
DD	del inglés, Dominio de Muerte
DED	del inglés, Dominio Efecto de Muerte
DISC	del inglés, Complejo de Señalización Inductor de Muerte
DN-FADD	Dominante Negativo de FADD
DMSO	Dimetilsulfóxido
DS	Desviación Estándar
ELISA	en inglés, <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
ERK	en inglés, <i>Extracellular signal-Regulated -Kinase</i>
FADD	en inglés, <i>FAS Associated Death Domain</i>
FCS	del inglés, Suero Fetal de Ternera
FITC	del inglés, isocianato de fluoresceína
FLIP	en inglés, FLICE-like Inhibitor Protein
gld	del inglés, enfermedad linfoproliferativa generalizada
IETD	en inglés, <i>Z-I-E(ome)-T-D(ome)-fluoromethylketone</i>
Ig	Inmunoglobulina

IL	Interleuquina
IKK	en inglés, <i>IκB kinase</i>
IκBα	del inglés, inhibidor α del factor de transcripción nuclear κB
IFN	Interferón
<i>lpr</i>	del inglés, linfoproliferación
MAPK	en inglés, Mitogen Activated Protein kinases
MHC	del inglés, Complejo Principal de Histocompatibilidad
NF-κB	del inglés, factor de transcripción nuclear κB
NK	célula asesina, del inglés <i>Natural killer</i>
PHA	del inglés, Fitohemaglutinina
PBS	del inglés, Tampón Fosfato Salino
PE	del inglés, Ficoeritrina
PI3K	del inglés, Fosfatidil Inositol 3-quinasa
PKC	del inglés, Proteína Quinasa C
_rIL-2	Interleuquina 2 recombinante
_rFAS-L	Ligando de FAS recombinante
SMAC	del inglés, Complejo de Activación Supramolecular
TCR	del inglés, Receptor de Antígeno de la célula T
Th	del inglés, células T colaboradoras
TGF-β	del inglés, Factor de Crecimiento Tumoral B
TLR	en inglés, <i>Toll-like receptor</i>
TNF	del inglés, Factor de Necrosis Tumoral
TRAF	en inglés, <i>TNF Associated Factor 6</i>
T[H³]	Timidina tritiada
v-FLIP	del inglés, <i>viral FLIP</i>
zVAD	benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-fluoromethylketone

SUMMARY

Tolerance is a hallmark of the adaptive immune system, which responds to a vast diversity of microbial antigens but does not normally react to self antigens. The capacity of the immune system to prevent specific responses by self-reactive T cells is a fundamental factor for maintenance of immune homeostasis and tolerance. FAS, a member of the tumor necrosis factor receptor family, is critical for tolerance induction; its deficiency leads to lymphadenopathy and autoimmunity development in both *lpr* mice and autoimmune lymphoproliferative syndrome patients bearing FAS mutations (ALPS type Ia).

The interaction of FAS with its ligand (FAS-L) induces apoptosis of activated T cells *in vitro* by recruiting the FAS-associated death domain (FADD) adaptor protein, which in turn activates a caspase cascade and subsequent apoptosis. Lack of FAS-triggered apoptosis in activated T cells is generally considered the origin of the *lpr* and the ALPS phenotypes. FAS-mediated death of T lymphocytes was assumed to be essential for eliminating cells that repeatedly encounter self antigens. Apoptotic defects are nonetheless insufficient to justify the lymphadenopathy and autoimmunity observed in *lpr* mice. The argument that apoptosis defects are not the only cause of autoimmune disease in these animals is supported by data showing that deficiency in FADD or caspase-8 leads to lack of T cell apoptosis, but not to disease manifestations. Moreover, despite the well-established role of FAS-mediated cell death *in vitro*, the *in vivo* relevance for FAS apoptosis induction is debated.

Defective cell cycle regulation is linked to loss of tolerance. Since FAS-deficient T cells hyperproliferate *in vivo*, and apoptotic defects are insufficient to explain autoimmune disease in *lpr* mice and ALPS patients, we explored the relationship between FAS signaling and cell cycle control, to ascertain whether tolerance induction is the result of proliferative defects in FAS-deficient autoreactive T cells.

Our analysis of second mitogenic stimulation of *lpr* T cells showed that, in addition to its proapoptotic effect, the FAS receptor is a crucial regulator of activation and proliferation in apoptosis-surviving T cells. We showed that *lpr* and ALPS patients T cells hyperproliferate after repeated activation. Activated FAS-deficient T cell proliferation is mediated by caspase-dependent hyperactivation of NF- κ B and ERK, enhanced CDK2 activity, and reduced p21 expression. p21 overexpression by *lpr* T cells reduced hyperproliferation and subsequent lymphadenopathy and autoimmunity in *lpr* mice, confirming a direct link between FAS-dependent regulation of T cell cycling and homeostatic control.

These findings offer a new interpretation of the complex *lpr* mouse phenotype, as well as of ALPS. We propose that cell cycle regulation of activated T lymphocytes by FAS constitutes a checkpoint that complements the role of apoptosis in these cells. Our results suggest that homeostasis and tolerance in the immune system are critically affected by coordination between the cell cycle and apoptosis. The function of FAS as a negative cell cycle regulator reveals a new facet of FAS biology and offers fresh insights into T cell immune homeostasis.

III. INTRODUCCIÓN

“Our understanding of AICD is largely based on in vitro studies, and the role of FAS in T-cell deletion and self-tolerance in vivo remains unclear”

Lucy S.K. Walker and Abul K. Abbas, **Nature Reviews Immunology**. 2: 11-19; **2001**

1. Conceptos básicos sobre el Sistema Inmunológico y la inmunidad mediada por Células T

1.1 Componentes del Sistema Inmunológico

El Sistema Inmunológico se puede definir como un complejo entramado celular y molecular cuyo objetivo último es interactuar con el ambiente celular ajeno al propio organismo, con el fin de detectar y eliminar aquellos agentes potencialmente perjudiciales para la integridad del individuo. Los componentes celulares del Sistema Inmunológico se interrelacionan en un diálogo constante, que permite la organización y coordinación de estrategias de defensa efectivas contra los microorganismos invasores.

La primera línea de defensa la constituye los componentes del **Sistema Inmunológico Innato**. Los elementos esenciales de la inmunidad innata son: barreras físicas y químicas que impiden la entrada del agente infeccioso, mediadores solubles (como proteínas del complemento y citoquinas inflamatorias) y células fagocíticas (macrófagos y células dendríticas). Las acciones defensivas desarrolladas por el Sistema Innato son inespecíficas, estereotipadas y carecen de memoria inmunológica (capacidad de responder con más efectividad tras una primera respuesta ante un patógeno). Además de su papel como primera línea de defensa, la inmunidad innata, juega un papel fundamental en la inducción de respuestas específicas por parte de los integrantes del **Sistema Inmunológico Adaptativo**. Las características del Sistema Adaptativo son, especificidad muy concreta para distintos tipos de moléculas, especialización, que les permite responder de forma singular a distintos microorganismos y memoria inmunológica. Las respuestas inmunitarias específicas se clasifican en dos tipos, según el componente del Sistema Inmunitario que participa en la respuesta: Inmunidad Humoral, llevada a cabo por linfocitos B productores de anticuerpos, e Inmunidad Celular, llevada a cabo por linfocitos T.

1.2 Mecánica de la respuesta de las células T

1.2.1 Activación de las células T por antígenos extraños

El inicio de la respuesta de las células T contra los patógenos es, en esencia, dependiente de la interacción con las células dendríticas, elementos centrales del Sistema Inmunológico Innato especializados en captar y procesar antígenos para su presentación (revisado en^{1,2}). Las células dendríticas detectan la infección mediante la interacción de receptores de superficie que reconocen patrones moleculares conservados en la superficie de los patógenos (TLRs; del inglés abreviado, *Toll-like-receptors*). La activación del TLR tras unirse al ligando tiene como consecuencia la activación funcional de la célula presentadora, lo que permite la ingestión del microorganismo, la producción de citoquinas y quimioquinas pro-inflamatorias, la expresión en superficie de moléculas de co-estimulación, la pérdida de estructuras de adhesión y la adquisición

de una gran movilidad y capacidad de migración (revisado en^{3,4}). Tras la activación, las células dendríticas migran a las zonas T de los órganos linfoides secundarios, donde presentaran péptidos antigénicos derivados del patógeno asociados a moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC; del inglés abreviado, *Major Histocompatibility Complex*) de Clase I y Clase II a las células T vírgenes CD8⁺ y CD4⁺ respectivamente. La activación de las células T responde a una doble señal, la primera es fundamental y es la que se deriva del receptor de antígeno de las células T (TCR; del inglés abreviado, *T-Cell Receptor*) tras el reconocimiento específico de los complejos péptido-MHC. La segunda señal la proporcionan las moléculas co-estimuladoras, en especial la interacción de CD80 y CD86 (presentes en células preestadoras) con CD28 (expresado en células T), que promueve señales de supervivencia complementarias a la señal del TCR que dirigen y modulan positivamente la respuesta de las células T (revisado en^{5,6}).

1.2.2 Dinámica de respuesta de las Células T

Tras el reconocimiento antigénico y activación, las células T vírgenes inician una secuencia de respuesta destinada a la eliminación de los patógenos. Los clones de células T activados proliferan en respuesta al antígeno para aumentar el número de células reactivas capaces de reconocer y hacer frente al antígeno extraño, este proceso se denomina **expansión clonal**. La activación de la célula T conlleva también la diferenciación hacia células efectoras. En el caso de las células T colaboradoras CD4⁺ (en inglés abreviado, Th) la **función efectora** consiste en la secreción de citoquinas y quimioquinas que actúan autocrinamente sobre las propias células T y paracrinamente sobre otros tipos celulares, como células del Sistema Inmunitario Innato, células del endotelio vascular o células B, con el objetivo final de concentrar, favorecer y aumentar la respuesta inflamatoria en los focos de infección. Según el patrón de citoquinas que producen los linfocitos T CD4⁺ se pueden clasificar en Th₁, que secretan Interleuquina-2 (abreviado, IL-2) e IFN-γ y Th₂, que producen IL-4 e IL-5.

La activación de los linfocitos T CD4⁺ no sólo conduce al desarrollo de funciones efectoras destinadas a la eliminación del patógeno. Un subtipo celular dentro de las células T CD4⁺, conocido como células reguladoras (definidas fenotípicamente como CD4⁺Foxp3⁺CD25⁺), se encarga de producir citoquinas supresoras (como el factor de crecimiento tumoral β, TGF-β; o la Interleuquina-10, IL-10) que inhiben la proliferación linfocitaria y la activación de las células del Sistema Innato (revisado en^{7,8}). La acción de las células T reguladoras se centra en limitar la expansión e intensidad de la respuesta inmunológica, impidiendo una sobre-activación perjudicial para el organismo.

La principal función efectora de las células T citolíticas (CD8⁺) es la de mediar la destrucción de las células diana infectadas por virus y microorganismos intracelulares.

Como consecuencia del desarrollo e intensificación de la respuesta inmunológica se produce una progresiva eliminación del patógeno y un descenso de la carga antigénica. Tras el pico máximo de expansión clonal y actividad efectora se produce una **fase de contracción**,

consecuencia de la falta de estímulo, en la que las células T efectoras específicas de antígeno son eliminadas (revisado en^{9,10}). En ausencia de antígenos derivados del patógeno, las células T activadas dejan de recibir señales de supervivencia y activación por parte de las células presentadoras, que ya no captan ni procesan antígenos inmunogénicos. El sistema recobra así un estado inicial, tanto en lo que al número de linfocitos se refiere, como al estado de activación general.

Al término del proceso infectivo, tras la fase de contracción de la respuesta inmunológica, una pequeña porción de las células de la progenie que respondía al antígeno sobrevive y se transforma en células T de memoria específicas de antígeno. Las células T de memoria tienen la capacidad de sobrevivir por largos periodos de tiempo a la espera de una nueva infección por el patógeno. Ante una re-infección por el mismo microorganismo, estas células T tienen la capacidad de organizar una respuesta más rápida y efectiva que la generada inicialmente por las células T vírgenes (revisado en^{11,12}).

1.3 Tolerancia y autoinmunidad

Los individuos heredan de sus progenitores los genes que marcarán las características de especificidad de sus receptores de antígeno (TCRs). A medida que se produce la maduración linfoide, estos segmentos génicos se reordenan para dar lugar a la secuencia final que codificará el receptor maduro. Las múltiples posibilidades de combinación durante el reordenamiento dan lugar a un amplio repertorio de especificidades posibles. Los acontecimientos moleculares responsables de la expresión génica del TCR son de naturaleza aleatoria, no se ven influidos ni limitados por lo que es propio o extraño y por tanto, todas las especificidades que el repertorio genético permite son factibles. Como resultado, los linfocitos T inmaduros pueden expresar receptores capaces de reconocer tanto antígenos endógenos como exógenos. Sin embargo, una de las características esenciales del Sistema Inmunológico es su capacidad de reconocer y responder sólo frente a antígenos extraños. La ausencia de respuesta del Sistema Inmunológico frente a antígenos propios se denomina autotolerancia. La pérdida de autotolerancia da lugar a reacciones inmunitarias contra antígenos del propio organismo. Estas reacciones en su conjunto reciben el nombre de autoinmunidad y las enfermedades que producen se denominan enfermedades autoinmunes .

La autotolerancia es un fenómeno adquirido activamente. Por un lado se debe a la eliminación de los linfocitos capaces de reconocer antígenos propios durante el proceso de maduración en el timo (Tolerancia Central) (revisado en¹³). Por otro lado, un segundo nivel de control garantiza que, aquellos linfocitos con capacidad auto-reactiva que no han sido eliminados en el timo, sean incapaces de ser activados por autoantígenos, cuando estos son presentados por las células presentadoras en los órganos linfoides secundarios (Tolerancia Periférica) (revisado en¹⁴⁻¹⁶).

1.3.1 Tolerancia Central

En su conjunto, los procesos de selección tímica (en el caso de linfocitos T) permiten seleccionar, de entre todas las especificidades posibles, aquellas células T que expresan un TCR capaz de reconocer un péptido asociado a formas alélicas propias del MHC y además, incapaces de reaccionar cuando este péptido proviene de proteínas endógenas. La efectividad del proceso de selección tímica se basa en la correcta sucesión de los procesos de **Selección Positiva** y **Selección Negativa**. La Selección Positiva, es el proceso que hace posible la supervivencia de los timocitos cuyos TCRs son competentes en el reconocimiento de péptidos en un contexto de MHC propio y por tanto funcionalmente útiles. El proceso de Selección Negativa complementa al anterior en el camino de purificación del repertorio T. De entre todos los clones de células T seleccionados capaces de reconocer los complejos péptido/MHC propio se eliminan aquellos que los hacen con alta afinidad, es decir aquellas células T que portan un TCR auto-reactivo.

A pesar de que una gran parte de las células T auto-reactivas son eliminadas durante el proceso de selección central, no todos los antígenos endógenos son presentados en el timo, por lo que un pequeño porcentaje de células T con capacidad auto-reactiva sale a periferia. Un segundo nivel de control permite limitar la respuesta de las células T auto-reactivas en su encuentro definitivo con antígenos endógenos.

1.3.2 Tolerancia Periférica

La Tolerancia Periférica se define como la inducción de tolerancia frente a antígenos propios específicos de tejido no presentes en el timo. Los mecanismos de Tolerancia Periférica se pueden clasificar en dos grandes categorías: aquellos basados en evitar la activación de las células T auto-reactivas y aquellos en los que la activación de las célula T auto-reactiva por si misma, conducen a la puesta en marcha de mecanismos reguladores destinados a limitar la proliferación y diferenciación de las células activadas, así como a inducir su eliminación (revisado en¹⁴⁻¹⁷). Entre los primeros se encuentran los fenómenos de Ignorancia Clonal y Anergia Clonal:

a- *Ignorancia Clonal:* En este caso las células T no pueden activarse porque el antígeno específico está secuestrado en áreas no accesibles para los clones auto-reactivos, o bien porque la cantidad disponible de antígeno no es suficiente como para alcanzar el nivel requerido para el inicio de la respuesta de células T.

b- *Anergia clonal* debido al reconocimiento de antígenos propios en un ambiente co-estimulador incompleto: habitualmente, las células presentadoras de antígeno en los tejidos periféricos se encuentran en un estado de reposo y expresan bajos niveles de moléculas co-estimuladoras y citoquinas pro-inflamatorias. Si estas células presentan antígenos propios a células T y estos son reconocidos, la célula T puede volverse anérgica (funcionalmente incapaz de responder), al carecer de las señales complementarias precisadas en un proceso normal de activación por estimulación antigénica.

En algunos casos, la inducción de Tolerancia Periférica se ejecuta tras la activación del clon T auto-reactivo. Entre los principales mecanismos destinados a abortar la activación de las células T tras el reconocimiento antigénico se encuentran la acción de las *células T CD4⁺ reguladoras* y el proceso de *Muerte Celular Inducida por Activación* (en inglés abreviado, AICD).

a- Supresión de los linfocitos auto-reactivos mediante la acción de *Células T reguladoras CD4⁺CD25⁺*: Algunos linfocitos T que reaccionan con antígenos propios pueden no volverse anérgicos ni ser eliminados, pero su activación, lejos de producir una respuesta efectora de carácter auto-inmune, tiene como consecuencia la producción de citoquinas inmunosupresoras (IL-10, TGF- β), que inhiben y limitan la activación de otras células T auto-reactivas

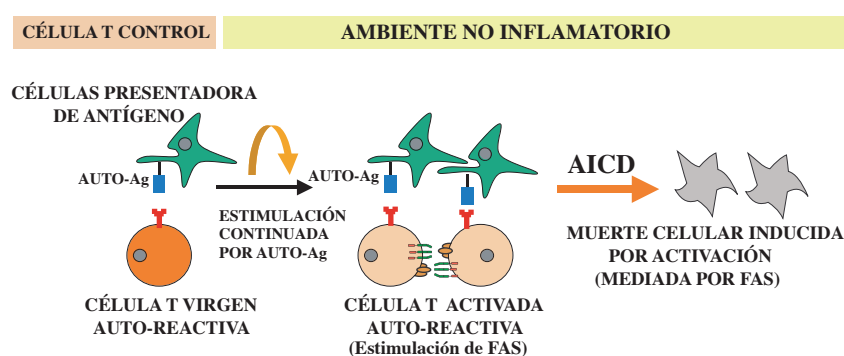
b- *Muerte Celular Inducida por Activación* debida a la estimulación por antígenos propios: El fenómeno de AICD como mecanismo de inducción de Tolerancia Periférica será ampliamente discutido en esta Tesis, por este motivo, a continuación se ofrece una perspectiva general de las bases conceptuales que han llevado a afirmar que la muerte por activación es esencial para el establecimiento de tolerancia de células T frente a antígenos propios.

La estimulación repetida *in vitro* de los linfocitos T mediante antígenos específicos o activadores policlonales, tiene como consecuencia la muerte por apoptosis de las células T activadas. Esta forma de inducción de muerte celular, que tiene lugar *in vitro*, se le conoce como AICD (revisado en ^{9,18,19}). En el modelo experimental de inducción de muerte por activación, las células T vírgenes son activadas inicialmente con mitógenos o antígenos. Tras la primera activación, las células son expandidas en cultivo con IL-2 y posteriormente re-estimuladas de nuevo de forma TCR-dependiente. La estimulación de las células T por segunda vez, tiene como consecuencia la muerte por apoptosis de gran parte de la población celular. La caracterización bioquímica y funcional de los fenómenos de apoptosis responsables de la AICD revelaron que FAS, una proteína transmembrana miembro de la superfamilia de receptores del TNF (del inglés abreviado, *Tumor Necrosis Factor*), es el responsable último del fenómeno de AICD observado *in vitro*. Se comprobó que, en células T activadas mediante protocolos de AICD, tiene lugar una fuerte regulación positiva del ligando de FAS (FAS-L) y que la interacción FAS/FAS-L, desencadena una ruta de activación de caspasas (aspartato-cisteín proteasas), cuya consecuencia final es la muerte celular (revisado en ^{10,18,20,21}).

En 1977 se describió una cepa de ratones que presentaban un fenotipo autoinmune caracterizado por la hiperplasia de los órganos linfoides secundarios, masiva acumulación de células T y una patología claramente asociada a procesos autoinmunes. En base a sus características fenotípicas, en un principio se pensó que el origen de la enfermedad, residía en un exceso de proliferación de las células T. A la mutación que definía a esta cepa de ratones se le denominó *lpr*, del inglés *lymphoproliferation*. Actualmente sabemos que la mutación *lpr* es una mutación autosómica recesiva, que impide la correcta expresión de FAS en las células de estos ratones²² (revisado en²³⁻²⁵). Como es de esperar, *in vitro*, las células T procedentes de estos

animales presentan una clara resistencia a la muerte inducida *in vitro* con los protocolos de AICD. Además, en 1995 se asociaron, por primera vez, mutaciones funcionales de FAS con el desarrollo de una patología humana que cursa con características similares a la enfermedad de los ratones *lpr*²⁶. Al igual que en el modelo animal, las células T de estos pacientes son resistentes a los protocolos de AICD.

Debido al marcado fenotipo autoinmune inherente a los defectos en FAS y en virtud de la función pro-apoptótica de FAS *in vitro*, se ha propuesto que la apoptosis dependiente de FAS ejerce un papel esencial en la homeostasis de la respuesta inmunológica (revisado en¹⁴⁻¹⁶). Se ha postulado que el proceso apoptótico dependiente de FAS es fundamental en la inducción de Tolerancia Periférica. Se ha conjeturado que los antígenos propios, que por ser ubicuos pueden estar presentes en altas concentraciones de forma constante, pueden estimular de forma reiterada a las células T específicas auto-reactivas. Mediante un paralelismo con lo observado *in vitro*, se ha aceptado que la activación repetida *in vivo* de la célula T por auto-antígenos, tendría como consecuencia la eliminación de los clones auto-reactivos mediante la apoptosis inducida por FAS^{16,22,27-29} (Esquema 1). Análogamente, se ha propuesto que la apoptosis mediada por FAS permite el control de la población activada de las células T CD4⁺ durante la fase de contracción de la respuesta inmunológica, eliminado por apoptosis los excedentes celulares, que ya no son necesarios tras la eliminación de un patógeno (revisado en^{9,19}).



Esquema 1. Modelo Clásico de desarrollo de autoinmunidad en ausencia de FAS. El encuentro reiterado de las células T auto-reactivas con antígenos propios provoca la regulación positiva de FAS y FAS-L, que tras interactuar, desencadenan la apoptosis de la célula T activada.

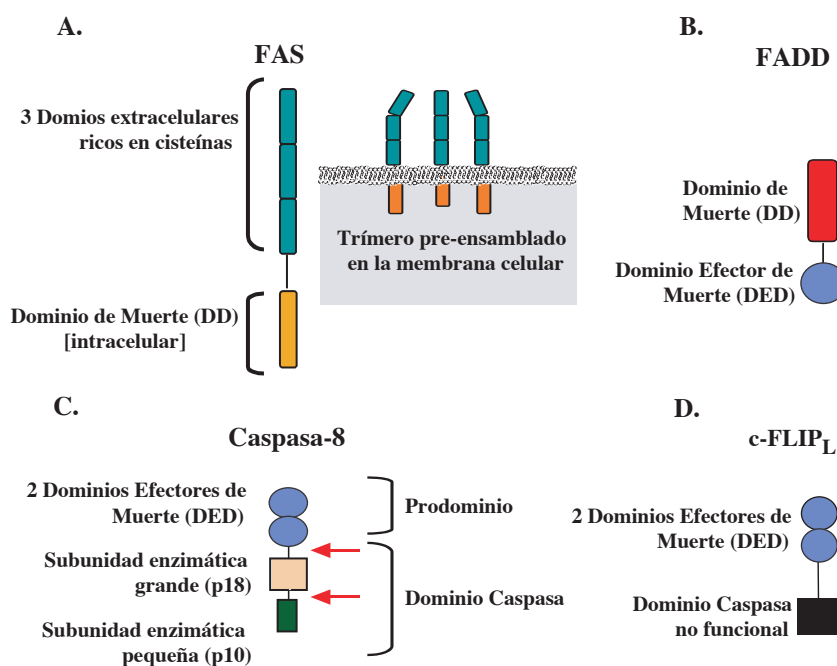
Sin embargo, a pesar de que *in vitro* la función apoptótica de FAS ha sido perfectamente caracterizada tanto funcional como molecularmente, el comportamiento *in vivo* de las células T procedentes de ratones *lpr* ponen en cuestión la relevancia funcional de la inducción de apoptosis por FAS en un contexto fisiológico. La gran mayoría de estudios no han detectado defectos en los procesos de selección negativa en los ratones deficientes en FAS cuando, en modelos de presentación de antígenos endógenos a nivel central, se comparaba la inducción de apoptosis en células T *lpr* y control³⁰⁻³³. Además, a pesar de que FAS media la inducción de apoptosis tras activación antigénica *in vitro*, varios trabajos confirman que no hay retraso en la fase de contracción

de la población de células T, cuando los ratones *lpr* son inmunizados con antígenos exógenos³⁴⁻³⁶. Los modelos de inducción de tolerancia frente a antígenos endógenos *in vivo*, confirman que FAS es esencial para el establecimiento de Tolerancia Periférica^{36,37}. Sin embargo, la inducción de apoptosis sólo ha podido ser demostrada formalmente con protocolos de inmunización muy específicos, en los que las células T específicas para el péptido inmunogénico representaba un elevado porcentaje respecto al total^{30,31,38,39}. En estas aproximaciones experimentales se induce un respuesta masiva y simultánea de células T, condición que ha llevado a poner en duda el carácter representativo de estos experimentos¹⁶, ya que, al inicio de una repuesta auto-inmunitaria, el porcentaje de células auto-reactivas respecto al total de células T es muy reducido, en especial si no hay alteraciones en los procesos de Tolerancia Central (información ampliada en el apartado de discusión).

2. Sistema apoptótico FAS/FAS-L

2.1 FAS

FAS fue caracterizado inicialmente como un receptor de membrana con capacidad para inducir muerte cuando las células eran tratadas *in vitro* con anticuerpos monoclonales anti-FAS⁴⁰. FAS, también llamado CD95, TNFR6, DR1 o APO-1, es una proteína transmembrana de Tipo I. En su región extracelular presenta tres dominios extracelulares ricos en cisteínas, lo que la identifica como un miembro característico de la superfamilia de receptores del TNF (revisado en^{10,18,19,25}).



Esquema 2. Estructura molecular de los principales componentes de la ruta de inducción de apoptosis mediada por FAS.

Mediante mutagénesis dirigida se comprobó que la capacidad de los anticuerpos monoclonales anti-FAS de inducir muerte celular, residía en una región de 80 aminoácidos moderadamente conservada de la porción citoplasmática de la proteína, denominada Dominio de Muerte (DD; del inglés abreviado, *Death Domain*) (Esquema 2). Este DD es también característico de moléculas de la superfamilia del TNF como TRAILR1, TRAILR2, TNFR1, DR6 o DR3. Colectivamente, los miembros de la superfamilia de receptores del TNF que portan un DD se les ha denominado Receptores de Muerte (en inglés, *Death receptors*) (revisado en⁴¹).

El DD no sólo ha sido hallado en este tipo de receptores, sino también en proteínas intracelulares relacionadas con la transducción de la señalización originada en los *Death receptors*. Tal es el caso de la proteína adaptadora FADD^{42,43} (del inglés abreviado, *Fas-Associated Death Domain*) (Esquema 2). Debido a este rasgo característico, al DD se le achaca la función de módulo de interacción proteína-proteína, entre receptores y moléculas intermediarias, fundamental para la interiorización de la señal (revisado en⁴⁴).

2.2 FAS-L

FAS es activado por FAS-L (también llamado CD95L, APO-1L o CD178), miembro característico de la familia de los ligandos de TNF (revisado en⁴⁵). FAS-L es una proteína de membrana Tipo II de 280 aminoácidos. Estudios de homología con otras moléculas de la misma familia y estudios de cristalización sugieren que FAS-L se ensambla en la membrana plasmática en forma homotrímeros a través de su dominio carboxi-terminal. A partir de la forma de membrana, se pueden liberar moléculas solubles por proteólisis. Estas formas solubles están constituidas por un homotrímero compuesto por la parte extracelular de FAS-L.

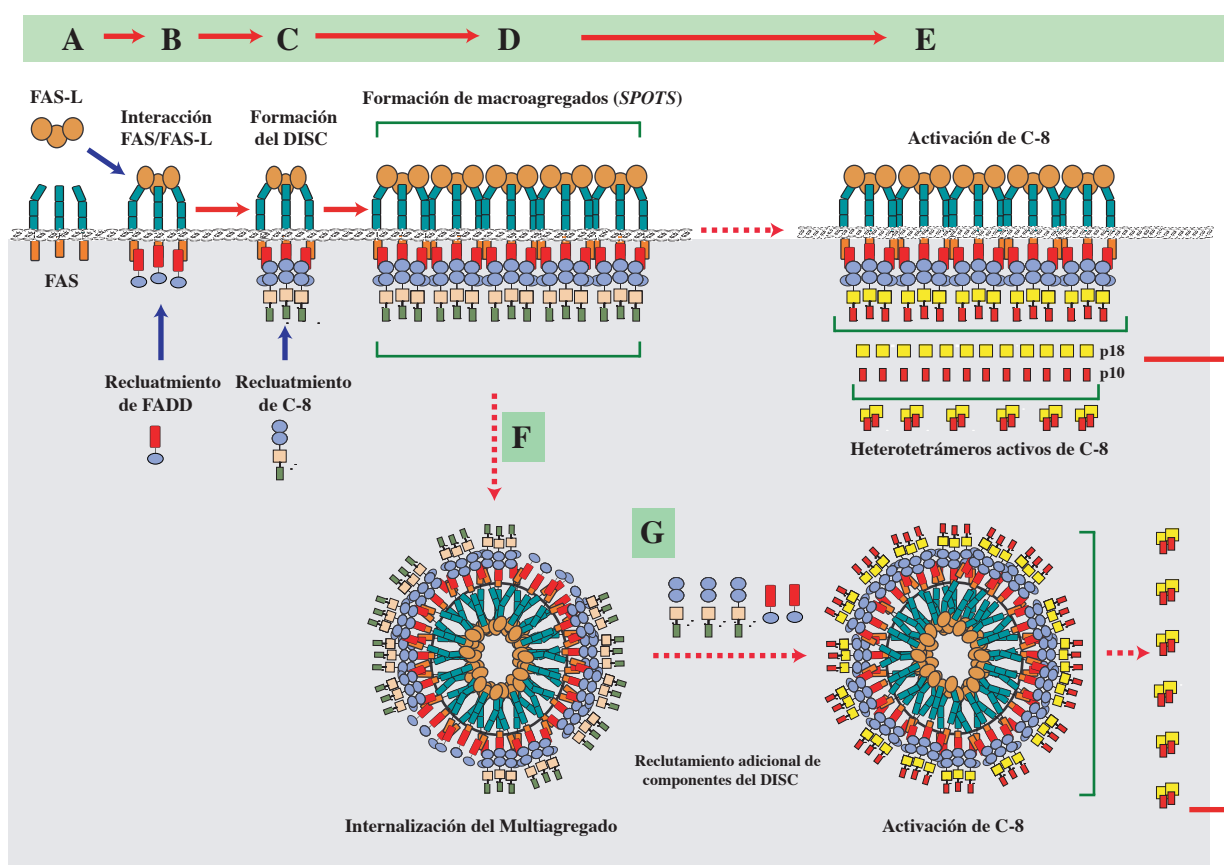
La expresión de FAS-L se regula positivamente a consecuencia de la activación por estimulación antigénica de las células T, especialmente en células que son activadas y cultivadas en presencia de IL-2⁴⁵⁻⁴⁸.

2.3 Mecanismo molecular de inducción de apoptosis mediado por FAS

El proceso de inducción de apoptosis mediado por FAS es el resultado de la sucesión de una serie de eventos discretos que, en conjunto, implican la re-organización sucesiva del receptor y las moléculas implicadas en la ruta de señalización de FAS en complejos multiproteicos de complejidad creciente (Esquema 3) (revisado en^{19,25}).

FAS se encuentra pre-ensamblado en la membrana celular en forma de homotrímero⁴⁹. La interacción con FAS-L provoca una re-organización del receptor pre-ensamblado. Esta re-organización comporta un cambio conformacional y/o de orientación de la región intracitoplasmática de FAS. Esta transición permite la formación de un complejo multiproteico, denominado complejo de señalización inductor de muerte (DISC; del inglés abreviado *Death Inducer Signalling Complex*) formado por FAS, FADD y las caspasas apicales (Caspasa-8,

C-8; en el caso de ratón; C-8 y C-10 en el hombre) (revisado en^{25,50}). Se ha propuesto que El DISC se define por un ratio estequiométrico 3:3:3 de FAS, FADD y C-8, los cuales se organizan en el contexto de la estructura trimérica del receptor pre-ensamblado tras unirse a un trímero de FAS-L. Tras la formación del DISC tiene lugar la re-organización masiva del receptor en grandes agregados multiméricos, formados por múltiples unidades de receptores con conformación trimérica y el DISC ensamblado (en ingles denominados, *SPOTS*). Se ha comprobado que la formación de los *SPOTS* es esencial para la inducción de apoptosis favoreciendo la concentración local de caspasas⁵¹. Recientemente se ha descrito que la internalización del receptor oligomerizado,



Esquema 3. Modelo esquemático de los eventos tempranos de señalización responsables de la inducción de apoptosis mediada por FAS. (A) FAS se encuentra pre-asociado en la membrana en forma de homotrímeros. (B y C) Tras interactuar con FAS-L, se produce un cambio conformacional que permite el reclutamiento secuencial de FADD y C-8 al dominio intracelular de FAS para la formación del DISC. (D) Tras la formación del DISC tiene lugar una re-organización del receptor en grandes macro-agregados, denominados *SPOTS*. (E) La formación de los *SPOTS* permite alcanzar los niveles necesarios de concentración local de caspasas, lo que posibilita la activación de la C-8 mediante su propio autoprosesamiento. (F y G) Ruta alternativa para la activación de la C-8 tras la formación de los *SPOTS*. Tras la formación del *SPOT* se produce la internalización del macro-agregado. La migración al compartimento endosomal facilita una segunda oleada de reclutamiento a FAS de los componentes del DISC. El reclutamiento masivo de C-8 tras la internalización permite alcanzar los niveles necesarios de concentración local de caspasas para la activación por autoprosesamiento.

por endocitosis dependiente de clatrina, puede ser un requerimiento adicional para la inducción de apoptosis en células Tipo I⁵² (como es el caso de los linfocitos T) (Esquema 2). Según los resultados publicados, una vez en el compartimento endocítico, se produce una nueva oleada de reclutamiento de los componentes de DISC a FAS, lo que permite alcanzar los niveles necesarios de concentración local de C-8 necesarios para el autoprocesamiento y la subsiguiente inducción de apoptosis.

2.3.1 Formación del DISC

Tras la interacción FAS/FAS-L, el cambio conformacional del receptor trimerizado permite el reclutamiento de la proteína adaptadora FADD a la cola citoplasmática de FAS^{42,43} (Esquema 2). Este reclutamiento está mediado por interacciones homotípicas Dominio de Muerte/ Dominio de Muerte (DD/DD) entre los respectivos DD de FAS y FADD.

Además del DD carboxi-terminal, FADD posee un dominio N-terminal de interacción proteína-proteína de aproximadamente 80 aminoácidos denominado Dominio Efector de Muerte (DED; del inglés abreviado, *Death effector Domain*). Este dominio está presente también en la C-8, lo que permite la interacción DED/DED entre C-8 y FADD (revisado en^{25,44,53}). La formación del DISC es un proceso secuencial en el que primero FADD es reclutado al DISC, por asociación con FAS mediante la interacción DD/DD y posteriormente se recluta la caspasa apical mediante interacciones DED/DED (Esquema 2).

Las caspasas son una familia de aspartato-cistein proteasas esenciales para la ejecución de la apoptosis. Las caspasas se sintetizan como proenzimas, con escasa actividad enzimática (procaspasas) y su activación es dependiente de su propio procesamiento proteolítico (revisado en⁵⁴⁻⁵⁶).

La estructura proteica de la procaspasa-8 (p52-inactiva) se puede subdividir funcionalmente en tres regiones:

- Un **prodominio** N-terminal formado por la doble repetición de un Dominio Efector de Muerte (DED)
- Una **subunidad enzimática grande** (p18)
- Una **subunidad enzimática pequeña** (p10).

En conjunto, ambas subunidades enzimáticas forman el Dominio Caspasa (en inglés, *Caspase Domain*) (Esquema 2).

Cada región está flanqueada por residuos de ácido aspártico, que constituyen sitios de corte especialmente sensibles a su propia actividad proteasa. El proceso de activación de procaspasa-8 se basa en un modelo de inducción por proximidad^{56,57}. La formación del DISC y la condensación en complejos multiméricos incrementa la concentración local de C-8, lo que conlleva un cambio conformacional que permite su inmediato autoprocesamiento. La consecuencia bioquímica del autoprocesamiento, es la liberación del prodominio de cada procaspasa-8 de una subunidad enzimática grande (p18) y subunidad enzimática pequeña (p10). Las diferentes subunidades,

procedentes de distintas caspasas autoprocesadas, se ensamblarán para formar heterotetrámeros (constituidos por dos subunidades enzimáticas grandes y dos pequeñas). Esta conformación tetramérica estabiliza la actividad enzimática proteasa constituyéndose la forma catalíticamente activa de la C-8 implicada en apoptosis (Esquema 3).

Una vez formado, el heterotetrámero se disocia del DISC liberándose al citosol, donde actuará sobre las caspasas efectoras C-3, C-6 o C-7. La activación de las caspasas efectoras y su consecuente actividad proteasa sobre sus sustratos específicos constituyen la fase efectora de la apoptosis, que culminará con la muerte celular.

2.3.2 Ruta de amplificación mitocondrial

En las células denominadas Tipo I, que incluyen timocitos y células T de periferia, se produce una gran cantidad de C-8 activa en el DISC, que por sí misma es suficiente para mediar la activación de las caspasas efectoras hasta un umbral crítico suficiente para la consecución de la apoptosis.

En otros casos, la activación de la C-8 en el DISC es débil o lenta y es preciso una red de amplificación de la señal apoptótica. En este proceso la caspasa-8 media la escisión de BID, dando lugar a una forma truncada de Bid (tBid; del inglés abreviado, *Truncated BID protein*). tBid se transloca a la mitocondria e induce la liberación de los factores mitocondriales proapoptóticos Citocromo-C y SMAC (del inglés abreviado, *Second Mithochondrial-derived Activator of Caspasas*, también llamado DIABLO). Esta liberación tiene lugar de forma BAX/BAK dependiente y por tanto, puede ser bloqueada por proteínas inhibitorias como Bcl-2 y Bcl-x_L.

Las células que precisan de esta ruta de amplificación mitocondrial para convertir la activación de la C-8 en una señal apoptótica, se denominan células Tipo II. En estas células (que incluyen hepatocitos o células tumorales como las células *Jurkat*) la apoptosis inducida por FAS puede ser inhibida por la sobre-expresión de Bcl-2 (revisado en ^{19,58,59}).

2.3.3 FLIP

Uno de los reguladores negativos fundamentales de la ruta de FAS, a nivel de la formación del DISC, es FLIP (del inglés abreviado, *Caspase-8 (FLICE)-like inhibitor protein*, también llamado CASPER, FLAME o I-FLICE) (revisado en⁶⁰). Originalmente, FLIP fue identificado como un producto de un gen viral presente en γ -herpesvirus y molluscipoxvirus (v-FLIP; del inglés abreviado, *viral FLIP*). El homólogo en mamíferos fue identificado posteriormente y denominado c-FLIP (del inglés abreviado, *cellular FLIP*). c-FLIP está presente en la célula en dos isoformas originadas por procesamiento alternativo: c-FLIP_L (del inglés abreviado, *cellular FLIP long form*) y c-FLIP_S (del inglés abreviado, *cellular FLIP short form*). En los linfocitos T, la sobre-expresión de ambas isoformas previene de la inducción de apoptosis mediada por FAS.

La estructura proteica de c-FLIP_L es muy similar a la de C-8 (Esquema 2). Al igual que esta, c-FLIP_L posee un doble dominio DED intacto, lo que le permite la interacción con el DED de FADD y su consecuente reclutamiento al DISC. Sin embargo, la porción C-terminal de c-FLIP_L (en inglés, *Caspase-like domain*), aunque de características muy similares a la de la C-8, carece de actividad enzimática debido a la sustitución de varios aminoácidos cruciales para la actividad catalítica de la enzima. En el caso de c-FLIP_S, el *Caspase-like-domain* es sustituido por una corta cola C-terminal sin actividad proteasa.

Ambas isoformas de c-FLIP compiten con la C-8 por la unión a FADD, a través de las interacciones DED/DED, pero, a diferencia de esta, al carecer de actividad enzimática no tienen propiedades pro-apoptóticas. Funcionalmente, c-FLIP_L y c-FLIP_S actúan como un dominante negativo de la C-8 bloqueando su reclutamiento al DISC y posterior autoproteólisis⁶¹⁻⁶⁴.

3. Patología autoinmune asociada a defectos en la ruta de FAS: Síndrome Autoinmune Linfoproliferativo

3.1 Síndrome Autoinmune Linfoproliferativo

El Síndrome Autoinmune Linfoproliferativo (en inglés abreviado, ALPS) es una patología de origen autoinmune que cursa con un cuadro diagnóstico característico de linfadenopatía y/o esplenomegalia, expansión de una población poco frecuente de células T conocida como células T Dobles Negativas CD4⁺CD8⁻TCR α/β ⁺ (en adelante abreviado DN) y defectos en la inducción de apoptosis mediada por FAS. Además, en su mayoría (70%), estos pacientes presentan elevados títulos de inmunoglobulinas en sangre y auto-anticuerpos, anemia hemolítica y/o trombocitopenia y activación linfocitaria crónica. Menos frecuentemente pueden presentar glomerulonefritis, neutropenia autoinmune, hepatitis autoinmune, Síndrome de Guillain–Barre, cirrosis biliar primaria, anticuerpos anti-nucleares, factor reumatoide o vasculitis. El desarrollo de los síntomas tiene lugar en la infancia (antes de los cinco años, en la mayoría de los casos entre los seis y doce meses) (revisado en^{25,29,65-67}).

Aunque la linfadenopatía es de origen no maligna, se ha comprobado que las mutaciones en FAS representan un factor de riesgo para el desarrollo de neoplasias. Los estudios en varias series de pacientes, con mutaciones en heterocigosis en el gen de FAS, demuestran que el riesgo de desarrollar linfomas no-Hodgkin así como linfoma Hodgkin fue, respectivamente, de 14 y 51 veces mayor de lo esperado⁶⁸.

3.1.1 Síndrome Autoinmune Linfoproliferativo: Diagnóstico molecular

El desarrollo de ALPS está ligado mayoritariamente a alteraciones moleculares que afectan a la expresión o funcionalidad de FAS. En función de la anomalía genética que subyace tras el desarrollo de la sintomatología, se ha clasificado el ALPS en cuatro subtipos distintos:

Tipo 0: Completa deficiencia en la expresión de FAS. Estos casos son consecuencia de mutaciones homocigóticas que impiden la expresión de FAS.

Tipo Ia: Mutaciones dominantes en heterocigosis que afectan a la expresión o funcionalidad de FAS. Este subtipo engloba, con diferencia, a la gran mayoría de pacientes de ALPS descritos. Además, más de la mitad de los pacientes de ALPS Tipo Ia presentan mutaciones en el exón 9 del gen de FAS. Este exón codifica la información para el DD. En estos casos la expresión en membrana y el pre-ensamblaje de FAS tienen lugar con normalidad, pero tras la interacción con FAS-L, el reclutamiento de FADD y posterior activación de caspasas es defectuoso.

Tipo Ib: Mucho menos frecuente, este subtipo engloba pacientes que presentan mutaciones que afectan a la expresión de FAS-L.

Tipo II: Pacientes de ALPS con mutaciones que afectan a la funcionalidad de la Caspasa-10 (2 casos descritos). En estos casos se presentan las típicas manifestaciones inherentes al ALPS, incluido el defecto apoptótico, pero una correcta expresión de FAS en membrana sin alteraciones funcionales descritas.

Tipo III: Los pacientes de ALPS tipo III presentan las características clínicas y diagnósticas típicas de ALPS pero sin mutaciones descritas en FAS, FAS-L, Caspasa-10, C-8 o FADD. Dentro de este grupo encontramos dos subcategorías en función de la resistencia a apoptosis mediada por FAS: Un grupo de pacientes de ALPS tipo III presenta una resistencia moderada a la inducción de apoptosis. En otros casos, los pacientes presentan una susceptibilidad normal a la apoptosis inducida por FAS.

3.2 Modelos animales con defectos en la expresión o funcionalidad de FAS o FAS-L

Diversas cepas naturales de ratones desarrollan características muy similares a las descritas en los pacientes de ALPS: linfadenopatía, acumulación de células T DN, acumulación de células T de memoria, hiperganmaglobulinemia, anticuerpos anti-nucleares, glomerulonefritis, artritis, vasculitis, defectos apoptóticos en la ruta de FAS y alto riesgo de desarrollo de linfomas. El análisis genético de estas cepas reveló que el desarrollo de la patología autoinmune estaba ligada, al igual que en el caso de los pacientes de ALPS, a defectos en la expresión o funcionalidad de FAS o FAS-L (revisado en ^{23,25,29,69,70}).

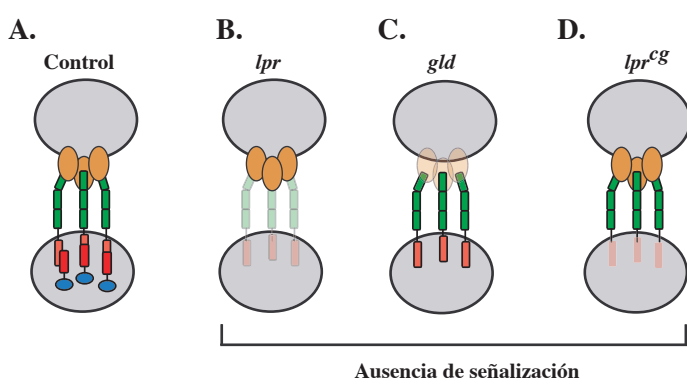
3.2.1 Cepa *lpr*: En estas cepas, el alelo *lpr* (linfoproliferación) en homocigosis (*lpr/lpr*), tiene como consecuencia una profunda deficiencia en la expresión de FAS y consecuente resistencia a apoptosis de las células T (Esquema 4). La mutación autosómica recesiva *lpr* se produce por la inserción de un retrotransposón dentro de un intrón, lo que da lugar a una transcripción alterada y una ausencia de expresión de FAS en la membrana celular^{22,71}. La enfermedad desarrollada por los ratones *lpr* es uno de los modelos de autoinmunidad más utilizados en investigación. Aunque los rasgos definitorios de la enfermedad se mantienen, la severidad del fenotipo autoinmune tiene un gran componente genético. En el fondo genético MRL la gravedad de la enfermedad *lpr* es

cuantitativamente mayor a la desarrollada en el fondo C57BL/6. El modelo *Knock out* para FAS desarrolla un cuadro idéntico al modelo *lpr*⁷².

3.2.2 Ceba *gld*: El fenotipo *gld* (del inglés, enfermedad linfoproliferativa generalizada) es debido a una mutación autosómica recesiva en el dominio extracelular de FAS-L que impide su correcta interacción con el receptor^{73,74} (Esquema 4).

3.2.3 Ceba *lpr^{cg}*: La mutación *lpr^{cg}* se localiza en el DD de FAS. Las alteraciones en el DD impiden el correcto reclutamiento de FADD a la región intracelular de FAS, lo que impide la correcta señalización apoptótica⁷¹ (Esquema 4).

El fenotipo desarrollado por estos ratones es equivalente, con variaciones sólo en la cinética de aparición de la sintomatología. Aunque en estos modelos existe un defecto evidente en el establecimiento de Tolerancia Periférica, los estudios realizados demuestran que no presentan defectos en Tolerancia Central en células T³⁰⁻³³.



Esquema 4. Modelos animales con defectos en la expresión o función de FAS y FAS-L. (A) Célula T control. (B) Célula T *lpr*, defecto en la expresión de FAS. (C) Célula T *gld*, producción de FAS-L incapaz de unirse al receptor. (D) Célula T *lpr^{cg}*, las mutaciones en el Dominio de Muerte de FAS impiden la formación del DISC.

4. Consecuencias inmunológicas del defecto en la expresión o funcionalidad de FADD y Caspasa-8

Clásicamente se ha considerado que la hiperactivación linfocitaria, la hiperplasia crónica de los órganos linfoides secundarios y los procesos autoinmunes desarrollados en ratones *lpr* y pacientes de ALPS, son consecuencia de una progresiva acumulación de linfocitos que no responden a la muerte por apoptosis. Esta afirmación condiciona el desarrollo de autoinmunidad a defectos en la inducción de apoptosis. El desarrollo de modelos animales con alteraciones en la expresión o funcionalidad de FADD y C-8, intermediarios directos de la ruta de FAS, ha añadido un nuevo nivel de complejidad a la hora de entender el origen del fenotipo autoinmune asociado a los defectos en FAS o FAS-L. La ausencia de FADD o C-8 en diversos modelos animales y patologías humanas no reproducen el fenotipo de los ratones deficientes en FAS, a pesar de la resistencia a la muerte celular inducida por activación que, al igual que en el modelo *lpr*, manifiestan las

células T tras ser activadas o tratadas con anticuerpos anti-FAS *in vitro*. Contrariamente a lo esperado, la deficiencia de FADD o C-8 genera un fenotipo de inmunodeficiencia generalizada, carente de rasgos autoinmunes. Sorprendentemente las células T con alteraciones en la expresión de FADD y C-8 manifiestan claros defectos proliferativos tras activación *in vitro*. Los resultados obtenidos con estos modelos cuestionan frontalmente la subordinación directa del desarrollo de autoinmunidad a defectos apoptóticos dependientes de alteraciones en la ruta de FAS y plantean una relación funcional entre componentes de la señalización apoptótica y los mecanismos de control de la proliferación de células T.

4.1 Defectos en la proliferación de las células T asociados a defectos en FADD

Numerosas aproximaciones experimentales han permitido asentar que FADD es un mediador fundamental en la proliferación de las células T. A diferencia de los ratones *lpr*, que a pesar del fenotipo autoinmune son viables, los ratones FADD deficientes (FADD^{-/-}) son letales embrionarios, que mueren a día nueve de gestación a consecuencia de un fallo en el desarrollo cardíaco⁷⁵. Debido a la letalidad de los ratones deficientes en FADD se han generado diferentes modelos que permiten estudiar específicamente el efecto de la ausencia, o falta de funcionalidad de FADD, en células T. Varios grupos han desarrollado modelos basados en la sobre-expresión de un Dominante Negativo de FADD (DN-FADD^{+/+}) con alteraciones en el DED (*Death effector Domain*) que impiden el reclutamiento de la C-8 al DISC⁷⁶⁻⁸⁰. En estos ratones la expresión del transgén está controlada por el promotor de *lck*, quedando restringida a células T. Los estudios llevados a cabo demuestran que la sobre-expresión del Dominante negativo de FADD bloquea la apoptosis inducida *in vitro*, mediante activación o tratamiento con anticuerpo anti-FAS, tanto en timocitos como en células T de periferia CD4⁺ o CD8⁺. A pesar de la resistencia a apoptosis, estos ratones no desarrollan adenopatía, no acumulan células T Doble Negativas (CD4⁻CD8⁻TCR⁺), no acumulan células T de memoria y no presentan síntoma alguno de autoinmunidad. Curiosamente, la estimulación *in vitro* de las células T de estos ratones con anti-CD3, anti-CD3 + anti-CD28 o Concanavalina-A (Con-A), reveló una menor respuesta proliferativa a consecuencia de la expresión del Dominante negativo. La expresión de un TCR transgénico para Ovoalbumina en las células T DN-FADD^{+/+} permitió confirmar que FADD es fundamental para la correcta inducción de la respuesta antígeno-específica *in vivo*⁷⁹. Estos resultados fueron confirmados en un modelo de infección con virus de la meningitis linfocítica, en el cual los ratones DN-FADD^{+/+} presentaban defectos en la tasa de aclaración viral⁸¹. Resultados similares se obtuvieron cuando se analizaron ratones *knock out* con deficiencia específica de FADD en células T⁸² o ratones quimera FADD^{-/-} en un fondo RAG^{-/-}⁸³ (En estos ratones células madre embrionarias procedentes de un ratón FADD^{-/-} fueron inyectadas en un blastocisto de C57BL/6-RAG^{-/-} para generar quimeras FAD^{-/-}RAG^{-/-}). Ya que los ratones RAG^{-/-} son incapaces de generar células B o T maduras, todas los linfocitos presentes en los ratones FAD^{-/-}RAG^{-/-} procederán de las células madre FADD^{-/-} y por tanto serán deficientes en FADD.

En su conjunto, estos resultados apoyan la hipótesis de que FADD forma parte de una señal de supervivencia requerida para la activación y proliferación de las células T, fundamental para una respuesta antígeno-específica productiva. A pesar de la evidenciass experimentales, el mecanismo molecular que liga a FADD con la activación y proliferación TCR-dependiente continúa sin esclarecerse.

4.2 Defectos en la proliferación de las células T asociados a defectos en la activación o expresión de caspasas.

4.2.1 Requerimiento de la actividad caspasa en la proliferación y activación de las células T

Varios trabajos han demostrado que, además de su papel apoptótico, la actividad caspasa es requerida en multiples aspectos relacionados con la activación y el desarrollo celular (revisado en ^{55,84,85}). En células T primarias, el empleo *in vitro* de inhibidores farmacológicos de la actividad caspasa, tiene como consecuencia la brusca inhibición de la proliferación tras la activación del TCR^{80,86,87}. En el año 2002 se describieron dos pacientes que presentaban una sintomatología con rasgos comunes al ALPS (ligera adenopatía y resistencia a apoptosis inducida con tratamientos con anti-FAS) pero que, a pesar del mayor número de linfocitos y su resistencia a la muerte, presentaban una profunda inmunodeficiencia (con infecciones pulmonares y de herpesvirus recurrentes) y bajos niveles de inmunoglobulinas en sangre. El análisis genético reveló que ambos pacientes eran homocigotos para una mutación en el gen de la C-8, que ocasionaba la pérdida de la actividad enzimática y la desestabilización de la proteína (cambio de Arg por Trp en el residuo 248 de la subunidad p18 de la C-8). *In vitro*, la pérdida de funcionalidad de la C-8 en estos pacientes se asociaba con defectos proliferativos de las células T, células B y células NK (del inglés abreviado *Natural Killer*). La implicación en proliferación de la C-8 se confirmó inhibiendo la expresión de la proteína mediante tecnología de RNA interferente en células T humanas obtenidas de sangre periférica⁸⁸.

Aunque en ratones la deficiencia en C-8 resulta letal embrionaria, la generación de modelos con deficiencia condicionada de C-8 en células T permitió extender el estudio en el modelo animal. Estos ratones presentan un complejo fenotipo^{89,90}. A edades tempranas manifiestan una acusada inmunodeficiencia caracterizada por bajo número de linfocitos T en periferia (a pesar de un desarrollo tímico sin alteraciones) e incapacidad de organizar una respuesta inmunológica efectiva ante una infección viral. Con la edad los ratones desarrollan un extraño síndrome linfoproliferativo mortal que se caracteriza por la infiltración de células T en el parénquima pulmonar, renal y hepático. Independientemente de la edad, las células T de estos ratones presentan una clara deficiencia proliferativa al ser estimuladas *in vitro* con anti-CD3, anti-CD3 + anti-CD28 o anti-CD3 + IL-2.

Al igual que en el modelo *lpr*, las células T C-8^{-/-} son resistentes a la inducción de apoptosis mediada por FAS. Sin embargo, a pesar de la resistencia a la muerte, los ratones deficientes en C-8 no presentan los rasgos definitorios del fenotipo autoinmune de los ratones *lpr*: acumulación de células T Doble Negativas, glomerulonefritis, altos niveles de autoanticuerpos en suero, formación de inmunocomplejos o hiperactivación de células B. La ausencia de correlación entre defectos apoptóticos asociados a deficiente activación de la C-8 y el desarrollo de autoinmunidad es evidente también en el modelo de ratón transgénico para CrmA. Las células T de estos ratones sobre-expresan un inhibidor viral de C-8, que las protege de la apoptosis inducida por FAS. A pesar del defecto apoptótico, estos ratones no presentan ninguno de los rasgos inherentes a los ratones *lpr*.

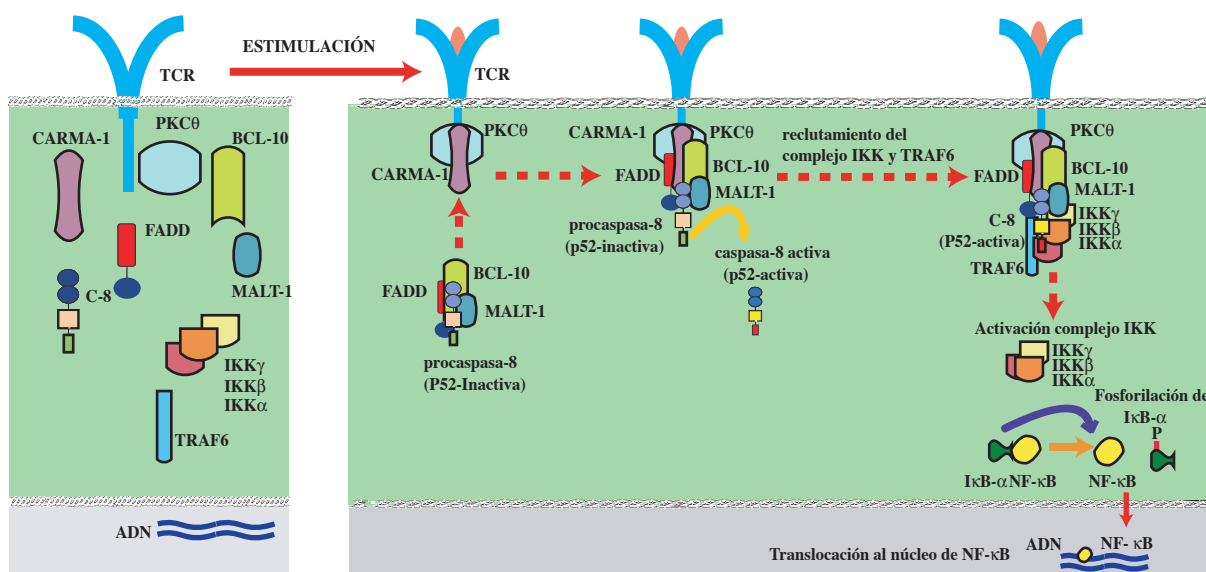
Estos resultados confirman que las caspasas y en especial la C-8, además de ser elementos centrales en el proceso de inducción de apoptosis, son esenciales para la correcta proliferación TCR dependiente de las células T.

4.2.2 La Caspasa-8 es esencial para la activación TCR-dependiente de NF-κB

Recientemente se ha descrito que la C-8 es fundamental para la correcta activación TCR dependiente del factor de transcripción nuclear κB⁹¹⁻⁹⁴ (NF-κB; del inglés abreviado *Nuclear factor κB*), un factor de transcripción clave para la inducción de genes esenciales para la proliferación y supervivencia de las células T⁹⁵ (Esquema 5).

El contacto productivo entre una célula presentadora de antígeno y la célula T específica, induce la formación de una estructura molecular denominada Complejo de Activación Supramolecular (en inglés abreviado, SMAC), en el que se integran y coordinan múltiples proteínas implicadas en las distintas rutas de activación molecular que modulan la respuesta de las células T. Uno de los eventos moleculares fundamentales para la activación de NF-κB tras la activación del TCR, es el reclutamiento de la PKCθ (del inglés abreviado, *Ca²⁺-independent protein Kinase C*) a la zona central del SMAC (cSMAC), donde co-localiza con el TCR (revisado en⁹⁶⁻⁹⁸). En este contexto, PKCθ se une y fosforila a CARMA-1⁹⁹⁻¹⁰². La fosforilación de CARMA-1 favorece un cambio alostérico que permite el reclutamiento de BCL-10 y MALT-1 al entramado molecular del cSMAC. Este es el primer paso para la formación de un gran complejo de activación multimolecular entre cuyos integrantes se incluyen, además de PKCθ, CARMA1, BCL10 y MALT-1, elementos reguladores esenciales de la ruta de NF-κB, como el complejo IKK (del inglés abreviado, *IκB kinase complex*) y TRAF6 (del inglés abreviado, *TNF Receptor Associated Factor 6*). En este microambiente molecular se produce la activación del complejo IKK, que a su vez fosforila al inhibidor α de NF-κB (en inglés abreviado, IκBα). IκBα mantiene retenidos en el citoplasma los elementos de unión al ADN de NF-κB (p50/p65). Tras la fosforilación, IκBα se degrada y una vez libre, NF-κB se trasloca al núcleo para iniciar su actividad como factor de transcripción (revisado en^{103,104}).

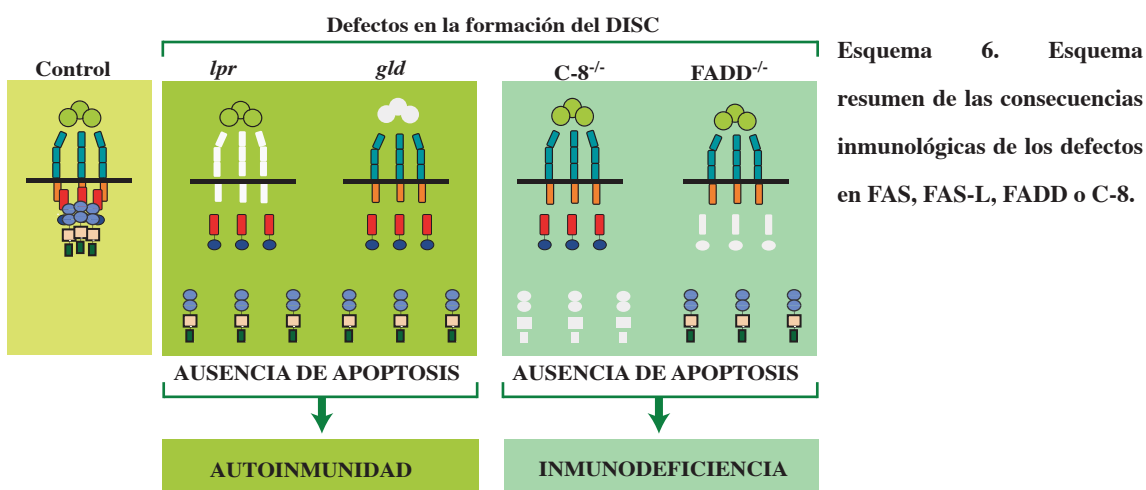
Mediante ensayos de inmunoprecipitación se ha comprobado que tras la activación del TCR, tanto FADD como C-8 son reclutados rápidamente al complejo formado por CARMA-1, BCL10 y MALT-1 (abreviado, complejo CBM). Los resultados obtenidos confirman que la C-8 interacciona físicamente con MALT-1 y BCL10 y que esta interacción es esencial para el reclutamiento al macrocomplejo del complejo IKK y TRAF6⁹¹⁻⁹³. La ausencia de C-8 impide el reclutamiento y activación del complejo IKK, la fosforilación de I κ B α y la traslocación al núcleo de NF- κ B. En base a los resultados se ha propuesto que C-8 actúa como un nexo de unión entre los complejos CBM e IKK.



Esquema 5. Modelo de activación de NF- κ B dependiente de la activación de la forma no procesada de la Caspasa-8 tras la estimulación del TCR. Tras la estimulación antigénica, la activación de la PKC θ da lugar a la fosforilación de CARMA-1, lo que permite al reclutamiento secuencial de BCL-10, MALT-1, FADD y C-8 a la zona central de la sinapsis inmunológica. En este contexto se produce la activación de la forma no procesada de la C-8 (transición p52-inactiva a p52-activa). La actividad enzimática de la C-8 permite el reclutamiento del complejo IKK y TRAF6 al complejo de señalización. Una vez en el entorno de señalización, el complejo IKK se activa. Tras la activación, el complejo IKK induce la fosforilación de I κ B α , lo que permite la liberación y translocación al núcleo de NF- κ B.

En la secuencia de acontecimientos ligada a la activación de NF- κ B dependiente de C-8, se ha comprobado que es necesaria la actividad enzimática de la proteína pero no su autoproteólisis. Tras la estimulación del TCR, la procaspasa-8 es reclutada al complejo CBM mediante la unión con MALT-1 y BCL-10. Ensayos de inmunoprecipitación demuestran que, en este contexto, la procaspasa-8 adquiere una conformación catalíticamente activa que favorece el reclutamiento del complejo IKK y TRAF6. A diferencia de lo que ocurre tras la formación del DISC, la activación de la C-8 a nivel del TCR no conlleva su autoproteólisis. La forma enzimáticamente activa requerida para la activación NF- κ B se corresponde con la forma no procesada de 52KDa de la C-8. El proceso por el cual se regula la activación de la C-8 en el contexto de la estimulación TCR-dependiente no está definido con detalle.

Estos resultados, conjuntamente con los obtenidos en los diversos modelos deficientes en FADD, indican que la ruta de señalización apoptótica y los eventos de activación que conducen a proliferación en células T están mutuamente relacionados y vinculados a una regulación común. Además, los resultados fenotípicos de los modelos deficientes en FADD y C-8 sugieren que el fenotipo autoinmune asociado a la falta de FAS es más complejo de lo esperado y no responde a una simple ausencia de muerte de las células T (Esquema 6).



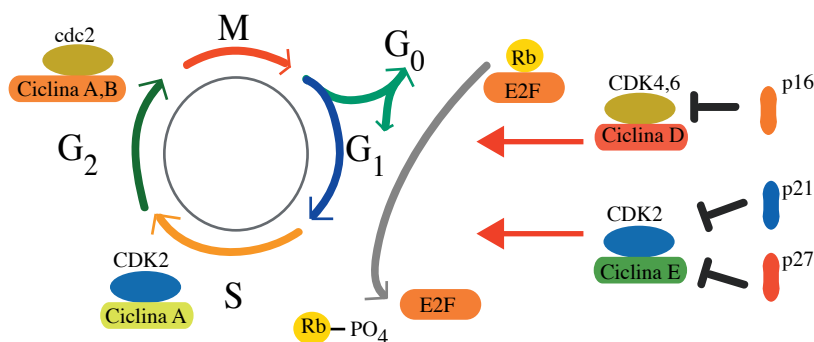
5. Papel del Ciclo Celular en inducción de Tolerancia Periférica

5.1 El Ciclo Celular

El conjunto de las distintas fases requeridas para la consecución final de la división celular constituyen el ciclo celular (revisado en¹⁰⁵). El control del ciclo celular se lleva a cabo a través de un complejo intrincado molecular, que gobierna la transición entre las diferentes fases ($G_0 \rightarrow G_1 \rightarrow S \rightarrow G_2 \rightarrow M$). Los dos componentes centrales de la maquinaria del ciclo celular son las Quinasas Dependientes de Ciclinas (en inglés abreviado, CDK) y las Ciclinas (revisado en^{106,107}). En ausencia de las Ciclinas, las CDKs permanecen en su forma inactiva. Tras la asociación entre ambos tipos de moléculas, las CDKs adquieren capacidad catalítica. El ensamblaje y activación de los complejos Ciclina/CDK permite y estructura el avance a través de las diferentes etapas del ciclo celular (Esquema 7).

El punto clave en la regulación del ciclo celular tiene lugar durante las primeras dos terceras partes de la fase G_1 . La presencia de un estímulo mitótico de forma continua durante esta estrecha ventana temporal, es un requisito fundamental para que las células completen el proceso de división. En ausencia de señales mitóticas la proteína Retinoblastoma (abreviado, Rb) se encuentra sin fosforilar. En este estado, Rb se mantiene unido a distintos miembros de la familia de factores de transcripción E2F, impidiendo su translocación al núcleo. La actividad

de estos factores de transcripción es esencial para la síntesis de los intermediarios precisos para organizar el avance a través de las distintas fases del ciclo celular. Las Ciclinas tipo D (D1, D2, o D3) actúan asociándose a CDK4 o CDK6, lo que pone en marcha la fosforilación preliminar de Rb. Esta fosforilación inicial predispone a Rb para una subsiguiente hiperfosforilización de la mano de los complejos Ciclina E/CDK2. Tan sólo tras esta modificación Rb se libera del factor de transcripción, permitiendo su translocación al núcleo y la entrada definitiva en fase de Síntesis (Fase S)



Esquema 7. Esquema resumen del Ciclo Celular en eucariotas. La replicación celular se divide en cuatro fases, atendiendo a los procesos moleculares que en ellas tienen lugar: *Fase S*, fase de síntesis de ADN. *Fase M*, fase de separación. *Fases G₁* y *G₂*, interfases de crecimiento. En ausencia de división celular una célula entra en quiescencia, *Fase G₀*. La formación, activación y desactivación secuencial de varios complejos Ciclina/CDK controlan la transición entre las distintas fases. La activación de los complejos Ciclina/CDK está regulada por los inhibidores CDKs.

La actividad de los complejos Ciclina/CDK es reprimida por los inhibidores de CDKs. Según sus características estructurales y sus dianas CDK, se han definido dos familias de inhibidores: p16, p15, p18 y p19, pertenecen a la familia INK4 y se asocian s con CDK4 y CDK6; el otro grupo de inhibidores incluye p21, p27 y p57 (familia Cip/kip), que interfieren en el avance del ciclo celular al unirse, tanto a Ciclinas, como subunidades CDKs. p21, p27 y p57 inhiben a todas las CDKs en la transición G1/S (revisado en^{105,108}).

5.2 El control del Ciclo Celular es fundamental para el establecimiento de Tolerancia Periférica

En los últimos años se ha determinado que el correcto control del ciclo celular es fundamental para el establecimiento de Tolerancia Periférica. En nuestro laboratorio, hemos establecido un mecanismo alternativo de pérdida de tolerancia debido a la deficiencia del inhibidor de ciclo celular p21^{waf1/cip1} (en adelante p21)^{109,110}. Esta molécula se define funcionalmente como un mediador de la inducción de parada del ciclo celular vía P53 dependiente, como un regulador directo de la actividad CDK y como un gen cuya expresión se produce en concomitancia con la senescencia celular (revisado en^{105,108}). Los ratones p21^{-/-} desarrollan un fenotipo autoinmune con características comunes al fenotipo *lpr*, acumulación de células T de memoria, elevados títulos

de anticuerpos anti-DNA o glomerulonefritis, entre otras. El desarrollo de autoinmunidad en estos ratones está ligado a graves alteraciones en el control de la homeostasis proliferativa de las células T p21^{-/-}. Hemos comprobado que, *in vivo*, la ausencia de p21 tiene como consecuencia la proliferación incontrolada de las células de T CD4⁺ de memoria (CD4⁺CD44^{alto}CD62L⁻). El cultivo *in vitro* de las células T deficientes en p21 confirmó que el inhibidor de ciclo celular controla específicamente la activación y proliferación de las células T estimuladas repetidamente¹¹⁰.

El papel del ciclo celular en el control del desarrollo de autoinmunidad ha sido confirmado por otros grupos. Además de corroborar los resultados obtenidos con los ratones p21^{-/-}¹¹¹⁻¹¹³, se ha comprobado que defectos en la expresión de otros reguladores esenciales del ciclo celular como E2F2¹¹⁴ o Gadd45α, Gadd45β y Gadd45γ^{112,115} se asocian con el desarrollo de fenotipos autoinmunes similares al observado en los ratones p21^{-/-}. En todos estos modelos animales el desarrollo de autoinmunidad está ligado a una hiperproliferación y menor umbral de activación de las células T *in vitro* e *in vivo*. En ningún caso se observaron defectos *in vitro* en la sensibilidad a apoptosis en las células T.

La correlación entre hiperproliferación y autoinmunidad ha llevado a sugerir que el control de la proliferación de las células T tras la activación, es un requisito esencial para el establecimiento de Tolerancia Periférica¹¹⁶.

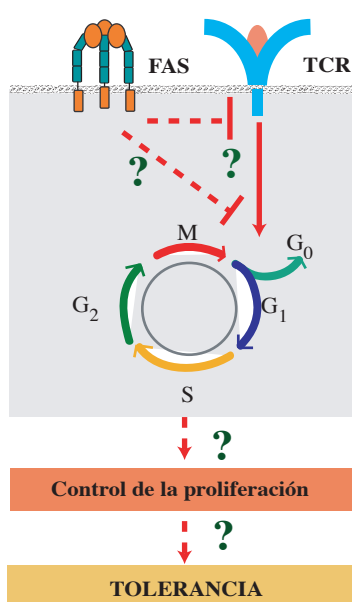


IV.OBJETIVOS

1. Objetivos

En la literatura podemos encontrar varias referencias que sugieren que, bajo condiciones homeostáticas, la deficiencia en FAS se asocia con un fenotipo hiperproliferativo de las células T^{36,117,118}. Morfológicamente, el análisis de los ganglios linfáticos de los ratones *lpr* y de los pacientes del Síndrome Autoinmune Linfoproliferativo revelan claros signos de hiperproliferación^{119,120}. De hecho, el nombre de la cepa, *lpr* (del inglés abreviado, *lymphoproliferation*), responde a las características anatómo-patológicas de los órganos linfoides de estos ratones, descritas inicialmente por los patólogos. Las áreas paracorticales de los ganglios linfáticos son hiperplásicas, contienen linfocitos de gran tamaño, con numerosas figuras mitóticas y la mayoría de células expresan el antígeno Ki-67, un marcador de proliferación activa. En el bazo, la expansión linfocitaria involucra la pulpa roja y en menor medida la pulpa blanca. Los linfocitos presentes en la pulpa roja manifiestan características proliferativas similares a las observadas en las áreas paracorticales de los ganglios linfáticos. La caracterización de FAS como un receptor de membrana con capacidad de inducir muerte en las células activadas, provocó que las anomalías proliferativas fueran interpretadas como una consecuencia indirecta del defecto apoptótico y no como un efecto real en la proliferación de las células T.

En nuestro grupo hemos comprobado que el control específico de la proliferación de las células T activadas es fundamental para el establecimiento de Tolerancia Periférica¹¹⁶. Dado que, *in vivo*, la ausencia de FAS se correlaciona con rasgos morfológicos hiperproliferativos y ya que la ausencia de apoptosis es insuficiente para justificar el fenotipo autoinmune de los ratones *lpr*, decidimos investigar el papel que, más allá de la apoptosis, podía tener FAS en el control de la activación y expansión de las células T, su relación con el ciclo celular y su contribución al desarrollo de autoinmunidad (Esquema 8).



Esquema 8. Resumen esquemático de los objetivos

planteados en esta Tesis. La metodología experimental aplicada en esta Tesis está destinada a esclarecer el efecto que, independientemente de la apoptosis, ejerce la señalización por FAS en el control de la activación y proliferación de las células T, así como la relevancia de esta posible función en el desarrollo de la patología autoinmune característica de los ratones *lpr*.

Resumen de Objetivos

- 1- Estudiar la posible función de FAS en el control de la activación y proliferación de las células T.
- 2- Caracterizar la posible función de FAS en la regulación de las principales vías de señalización ligadas a la activación y proliferación celular.
- 3- Definir el efecto de FAS sobre el control de la maquinaria del ciclo celular.
- 4- Comprobar el efecto en el desarrollo de autoinmunidad del control de la proliferación de las células T deficientes en FAS.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

“It remains unclear whether the immunological abnormalities observed in FAS deficiency in vivo result from either the proliferative and/or apoptotic defects”

Rathmell and Thompon, **Cell**,109, 97-107; **2002**

1. Materiales biológicos

1.1 Ratones

Los ratones control C57BL/6 fueron suministrados por Harlam Interfauna Ibérica (San Felú de Codines, España). Los ratones C57BL/6-*lpr*, C57BL/6-*gld*, CBA/J, CBA-*lpr*^{cg}, MRL-*lpr* y MRL-*mp*, fueron suministrados por Jackson Laboratory (Maine, USA). Los ratones heterocigóticos CBA-*lpr*^{cg+/-} fueron obtenidos mediante el cruce de ratones CBA-*lpr*^{cg} con ratones control CBA/J.

Los ratones C57BL/6-p21^{-/-} fueron obtenidos mediante el cruce de ratones p21^{-/-} 129/Sv x C57BL/6 (procedentes del Laboratorio de Gregory Hanon, Cold Spring Harbor Laboratory, New York; USA) con ratones C57BL/6 durante ocho generaciones¹¹⁰. Los ratones C57BL/6-*lpr*/p21^{-/-} se obtuvieron cruzando ratones C57BL/6-*lpr* con ratones C57BL/6-p21^{-/-}.

Los ratones C57BL/6/p21tg¹²¹ fueron generosamente facilitados por el laboratorio del Doctor. Arum Fotedar (Sydney Kimmel Cancer Center, San Diego; USA). Los ratones C57BL/6-*lpr*/p21tg se obtuvieron cruzando ratones C57BL/6-*lpr* con ratones C57BL/6/p21tg. Los ratones MRL-*lpr*/p21tg se obtuvieron mediante retrocruce durante más de nueve generaciones de ratones C57BL/6/p21tg con ratones MRL-*lpr*. Tanto en los ratones MRL-*lpr*/p21tg como en los ratones C57BL/6-*lpr*/p21tg, la expresión del transgén de p21 está controlada por el promotor de *Lck*. En ambos casos la expresión del transgén se ha mantenido en heterocigosis.

1.2 Pacientes

En esta tesis analizamos el perfil proliferativo de las células T procedentes de tres pacientes, pertenecientes a dos familias distintas no relacionadas, de Síndrome Autoinmune Linfoproliferativo Tipo Ia. El paciente de la familia A (P-FA) presentaba la mutación en el gen de FAS G493T (que provoca una sustitución de la Arg 234 por Leu); los pacientes de la familia B (P-1-FB y P-2-FB) presentaban la mutación en el gen de FAS T1045C (que provoca una sustitución de la Leu 268 por Pro). En ambos casos la mutación eran heterocigóticas y estaban localizadas en el exón 9 de FAS, que codifica para el DD de la proteína. Los pacientes de ambas familias presentaban hiperganmaglobulinemia e incrementos en el porcentaje de células T Doble Negativas (CD4⁺CD8⁺TCRα/β⁺). Ninguno de los sujetos recibió tratamiento alguno en los seis meses anteriores a la realización de los experimentos. Tanto el diagnóstico clínico, como los estudios moleculares, fueron realizados en la Unidad de Inmunología del Hospital Materno Infantil de La Paz (Madrid, España).

2. Preparaciones celulares

2.1 Obtención de células T de ratón

Las células T CD4⁺, o CD8⁺, fueron purificadas a partir de suspensiones celulares de bazo, mediante selección negativa con esferas magnéticas acopladas a anticuerpos específicos, Dynabeads (Dyna, Oslo; Norway).

Para la obtención de las suspensiones celulares, el bazo de los ratones fue disgregado sobre un filtro de 45µm (BD Biosciences, San Diego, USA) y eluido en tampón fosfato salino (en inglés, *Phosphate-buffered saline*; abreviado, PBS) suplementado con un 5% de Suero Fetal Bovino (en inglés abreviado, FCS) (Harlan, Sera Lab, Reino Unido). Tras esto, las células fueron tratadas con tampón de lisis eritrocitaria (NH₄Cl al 0,83%, Panreac; Barcelona) a temperatura ambiente durante un minuto. Posteriormente las células se lavaron (dos veces) y se resuspendieron en PBS suplementado con FCS (5%) y 5mM de EDTA (Panreac, Barcelona). El mismo tampón fue utilizado en los pasos posteriores.

Para la selección de células T CD4⁺, las suspensiones celulares libres de eritrocitos, se incubaron con Dynabeads pan-b220 y Dynabeads anti-CD8. Para la selección de células T CD8⁺ se incubaron con Dynabeads pan-b220 y Dynabeads anti-CD8. Tras la incubación (30min/4C°), las células fueron sometidas a la acción del efecto atrayente de una columna magnética y recuperada la fracción de células no retenidas. Tanto las condiciones de incubación, como el proceso de selección magnética, se realizó de acuerdo a indicaciones del fabricante. Como resultado del proceso de selección negativa, se obtuvieron poblaciones de células T CD4⁺ (o CD8⁺) con una pureza superior al 90%.

2.2 Obtención de células T Humanas.

Las células T de pacientes de ALPS Tipo Ia (o controles sanos) se obtuvieron a partir de sangre periférica mediante selección magnética negativa con la aplicación comercial MACS Pan T Cell Isolation Kit Human (Miltenyi Biotec, Bergish; Alemania), que permite aislar selectivamente las células T del total de sangre periférica. En un paso previo a la selección negativa, los eritrocitos fueron eliminados de la sangre mediante centrifugación en un gradiente de densidad de Ficoll-Hypaque (Mediatech Inc, Rendón, VA), a 2000rpm, durante un tiempo total de 20 minutos. Las células obtenidas fueron lavadas y resuspendidas en PBS suplementado con FCS (5%), 5mM de EDTA y 0,5% de albumina de suero bovino (en inglés abreviado, BSA).

En algunos experimentos se aislaron individualmente células T CD4⁺ y células T CD8⁺ mediante las aplicaciones MACS CD4⁺ T Cell Isolation Kit Human y MACS CD8⁺ T Cell Isolation Kit Human, respectivamente (en ambos casos de Miltenyi Biotec, Bergish; Alemania). Los mismo resultados se obtuvieron cuando se utilizaron linfocitos de sangre periférica (en inglés abreviado, PBLs) obtenidos mediante centrifugación, en un gradiente de densidad de Ficoll.

3. Cultivos celulares

3.1 Medios de cultivo

En todos los cultivos celulares se ha empleado medio RPMI-1640 (Gibco, Life Technologies, Paislay; Reino unido) suplementado con un 10% de suero de ternera fetal (FCS, Harlan, Sera Lab) y 100U/ml de Penicilina, 100µg/ml de estreptomicina, 2µM de L-glutamina, 50µM de 2B-mercaptoetanol, 1mM de sodio-piruvato y 10mM de HPES pH 7,4 (todos ellos de Gibco, Life Technologies).

3.2 Cultivo de células T de ratón

3.2.1 Protocolo largo de estimulación repetida

Las células T, purificadas por selección negativa, fueron estimuladas *in vitro* durante tres días, a una concentración celular de 1×10^6 células/ml, con Concanavalina A (Con A, Sigma, Sant Louis, Missouri) utilizada a 3µg/ml disuelta en medio RPMI completo suplementado con IL-2 recombinante (IL-2, 20ng/ml; Prepotech). En algunos experimentos, las células T fueron estimuladas con anticuerpo anti-CD3 (145.2C11, PharMingen, San Diego; CA) pegado a placa a razón de 1µg/ml en PBS, 100µl por pocillo. En ambos casos, tras tres días de estimulación (**Estimulación primaria, tres días de duración**), las células T fueron lavadas y resuspendidas en medio RPMI completo suplementado con IL-2 (20ng/ml). En estas condiciones, las células se mantuvieron en cultivo durante seis días (**Fase de expansión con IL-2, seis días de duración**). Para evitar el agotamiento de nutrientes en el medio de cultivo durante la fase de expansión, a los tres días, las células T se lavan y se renueva el medio de cultivo completamente.

Tras la fase de expansión las células T son lavadas y estimuladas por segunda vez (**Estimulación secundaria, tres días de duración**) con Con A (3µg/ml) (o anti-CD3 pegado a placa, 1µg/ml en PBS, 100µl por pocillo) en medio RPMI completo suplementado con IL-2 recombinante (20ng/ml), a razón de 1×10^6 células/ml por un periodo tres días. En algunos casos, la secuencia de estimulación-expansión-estimulación se repitió hasta alcanzar una octava estimulación.

En algunos experimentos la estimulación secundaria se combinó con el empleo de los inhibidores de actividad caspasa benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-fluoromethylketone (zVAD-fmk) (Bachem; Germany) o Z-I-E(Ome)-T-D-(Ome)-fluoromethylketone (z-IETD) (Medical & Biological Laboratories, Naka-ku Nagoya, Japan) a las concentraciones indicadas en el texto.

El inhibidor de la fosforilación de ERK-1/2 UO126 (Cell signaling, Danvers, MA) fue utilizado, según recomendación del fabricante, a una concentración de 10µM.

En algunos de los experimentos de estimulación secundaria realizados con células T CD4⁺

procedentes de ratones C57BL/6-*gld* se empleó FAS-L recombinante (FAS-L) a las concentraciones indicadas y según las recomendaciones del fabricante (Soluble FAS-L Recombinant Set FAS-L Kit, Alexis Biochemicals Corporation, Lausen; Switzerland).

En los experimentos en los que, tras la estimulación secundaria, fue necesario obtener una población compuesta por células T vivas, las células muertas se eliminaron mediante centrifugación en un gradiente de Ficol-Hypaque (2000rpm, 20min).

3.2.2 Protocolo corto de estimulación repetida

Las células T purificadas por selección negativa, fueron estimuladas *in vitro* (a razón de 1×10^6 células/ml) con Con A ($3 \mu\text{g/ml}$) en medio RPMI completo suplementado con IL-2 recombinante (20ng/ml), durante 24 h. (**Estimulación primaria, 24 h de duración**) Tras la estimulación primaria, las células fueron lavadas y resuspendidas en medio RPMI completo, suplementado con IL-2 (20ng/ml), para su expansión durante 24 h (**Expansión con IL-2, 24 h de duración**). Tras este periodo de tiempo, las células fueron lavadas y estimuladas por segunda vez con Con A ($3 \mu\text{g/ml}$) en medio RPMI completo suplementado con IL-2 recombinante (20ng/ml) a una concentración celular de $0,5 \times 10^6$ células/ml, por un periodo 48 h (**Estimulación secundaria, 48 h de duración**).

En algunos experimentos, la estimulación secundaria se combinó con el empleo de inhibidor de la actividad caspasa zVAD-fmk a una concentración de $50 \mu\text{M}$.

3.3 Cultivos de células T humanas

En los cultivos de células humanas, las células T purificadas de sangre periférica fueron estimuladas inicialmente, a una concentración celular de 1×10^6 células/ml, en medio RPMI completo con Con A ($3 \mu\text{g/ml}$) o anti-CD3 pegado a placa ($1 \mu\text{g/ml}$ en PBS, $100 \mu\text{l}$ por pocillo) o Fitohemaglutinina (PHA, $2 \mu\text{g/ml}$) (Roche, Basel; Switzerland), durante tres días (**Estimulación primaria**). Tras la primera estimulación, las células T fueron lavadas y resuspendidas en medio RPMI completo suplementado con IL-2 (20ng/ml) para su expansión durante nueve días (**Fase de expansión con IL-2**). Para evitar el agotamiento de nutrientes el medio de cultivo es renovado completamente cada 72 h.

Tras la expansión, las células T fueron estimuladas por segunda vez (a razón de 1×10^6 células/ml), con Con A ($3 \mu\text{g/ml}$) [o anti-CD3 pegado a placa ($1 \mu\text{g/ml}$ en PBS, $100 \mu\text{l}$ por pocillo) o PHA ($2 \mu\text{g/ml}$)] resuspendida en medio RPMI completo suplementado con IL-2 (20ng/ml), durante tres días (**Estimulación secundaria**). En algunos experimentos, la estimulación secundaria se combinó con el empleo de inhibidor de la actividad caspasa zVAD-fmk a una concentración de $200 \mu\text{M}$.

Para comprobar que las mutaciones en FAS adscritas a los pacientes de ALPS tipo Ia tenían consecuencias funcionales en la señalización mediada por el receptor, diseñamos experimentos de inducción de apoptosis con FAS-L recombinante. Así, las células T, procedentes de controles sanos

y pacientes, fueron estimuladas inicialmente durante tres días con Con A ($3\mu\text{g/ml}$). Tras la primera estimulación, las células se expandieron durante 6 días con IL-2 . A continuación las células T se lavaron y se renovó el medio sólo o suplementado con rFAS-L (500ng/ml), cuantificándose la inducción de apoptosis a las 24 h de cultivo mediante tinción de ciclo celular

4. Ensayos de proliferación y Tinción de ciclo celular

4.1 Ensayos de proliferación *in vitro*

4.1.1 Incorporación de Timidina Tritiada

En algunos experimentos la proliferación *in vitro* fue medida cultivando las células T en placas de 96 pocillos y cuantificando (a los tiempos indicados) la incorporación de Timidina Tritiada ($[^3\text{H}]$ -Timidina, $100\mu\text{Ci/pocillo}$; Hamersham Bioscience, Buckinghamshire, UK) durante el transcurso de un pulso de 16 h de duración. La cuantificación de la radioactividad incorporada se llevó a cabo en un contador Beta-plate counter β 1205 Wallac (Perkin Elmer), tras recoger las células en filtros de fibra de vidrio (Wallac) con un recolector semi-automático (Cell Harvester, Wallac).

4.1.2 Marcaje con CFSE

Las células T (5×10^6 células/ml) fueron inicialmente incubadas, durante 10 minutos a 37°C , con la sonda fluorescente CFSE (del inglés abreviado, 5-6-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester) (Molecular Probes, Leiden; Holanda) disuelta en PBS a una concentración final de $2,5\mu\text{M}$. Tras el marcaje, las células se lavaron tres veces en medio RPMI-1640 suplementado con un 5% de FCS. Tras este proceso las células T fueron estimuladas, según los requerimientos de cada experimento (indicados en el texto), y medida, por citometría de flujo, la pérdida de intensidad media de fluorescencia por CFSE a los tiempos indicados.

Con el objetivo de cuantificar la pérdida de CFSE sólo en células vivas, en algunos experimentos se añadió sobre la muestra $2\mu\text{l}$ de Ioduro de Propidio (IP) (DNA-Prep reagent Kit, Beckman Coulter) en el instante previo al análisis por citometría.

4.1.3 Cultivos mixtos de células T *lpr* y *gld*

Par la realización de los experimentos de cultivo mixto las células T CD4^+ , *lpr* y *gld*, fueron mantenidas por separado en cultivo hasta el final del periodo de expansión con IL-2 que sigue a la primera estimulación. Inmediatamente antes de la segunda estimulación, las células T fueron marcadas con las sondas fluorescentes CFSE o 5-6-carboxy SNARF (ambas de Molecular Probes, Leiden; Holanda). El procedimiento para el marcaje con SNARF es idéntico al descrito

anteriormente para el CFSE. Al comienzo de la segunda estimulación las células T *lpr* y *gld* fueron mezcladas y estimuladas con Con A ($3\mu\text{g/ml}$) en medio RPMI completo suplementado con IL-2 recombinante (20ng/ml) a razón de 1×10^6 células/ml, durante 72 h. Al término de este tiempo se evaluó la pérdida de intensidad de fluorescencia de las células T marcadas con CFSE, tanto en cultivos mixtos como simples. Dada la susceptibilidad a apoptosis de las células T *gld* al ser co-cultivadas en presencia de las células T *lpr* (que producen el FAS-L necesario para la inducción de muerte de las células *gld*), para evitar la pérdida excesiva de células *gld*, la relación de células *lpr/gld* utilizada fue de 1:3.

4.2 Ensayos de proliferación *in vivo*

Para medir la proliferación de las células T en condiciones homeostáticas de proliferación *in vivo*, utilizamos la técnica de cuantificación de incorporación del análogo de base 5-bromo-2'-deoxiuridina (abreviado, BrdU) (descrita en¹²²). El BrdU (Sigma, St.Louis, Mo) fue administrado en el agua de bebida de los ratones a razón de $0,8\text{mg/ml}$ durante nueve días, periodo tras el cual los animales fueron sacrificados. Durante este tiempo, al agua con BrdU fue renovada cada dos días.

Tras el sacrificio se prepararon suspensiones celulares a partir del bazo y ganglios linfáticos. La incorporación de BrdU en las distintas subpoblaciones de células T fue medida, por citometría de flujo, mediante una combinación de marcaje en superficie con anticuerpos anti-CD4, anti-CD8, anti-Thy1.2 y anti-B220 (para definir las poblaciones de células T: T CD8⁺, T CD4⁺ y células T Doble Negativas, Thy1.2⁺, CD8/CD4⁺, B220⁺) y tinción intracelular con un anticuerpo específico anti- BrdU (Ver tabla de anticuerpos Apartado 5. Citometría de flujo).

4.3 Tinción de ciclo celular

A los tiempos indicados en el texto, las células T ($0,5 \times 10^6$ células) fueron recogidas y lavadas con PBS. Tras este paso, se resuspendieron en $50\mu\text{l}$ de detergente (DNA-Prep reagent Kit, Beckman Coulter) y se añadieron $500\mu\text{l}$ de una solución de RNasa con Ioduro de Propidio (DNA-Prep reagent Kit, Beckman Coulter). La suspensión celular se incubó durante 30 minutos a 37°C para posteriormente analizarla en un citómetro de flujo Cytomics FC 500 (Beckman Coulter).

5. Citometría de flujo

Todas las tinciones de marcadores de superficie se realizaron incubando la suspensión celular correspondiente (durante 20 minutos a 4C°, en un volumen final de 50 μ l y en oscuridad) con los anticuerpos específicos indicados en el texto diluidos en PBS suplementado con un 5% se FCS, 1% de BSA y 5mM de EDTA. Tras el marcaje, las células se lavaron dos veces con PBS.

Tabla I: Relación de anticuerpos utilizados para el marcaje de células de ratón

ANTICUERPO	CASA COMERCIAL	CLON	ESPEC
Anti-B220-FITC ³	Coulter	RA36B2	Rata
Anti-B220-PE ⁴	Southern Biotech	RA36B2	Rata
Anti-BRDU-FITC ³	Becton Dickinson	B44	Ratón
Anti-CD4-APC ²	Pharmingen	RM4-5	Rata
Anti-CD4-SPRD ¹	Southern Biotech	GK1.5	Rata
Anti-CD8-APC ²	Pharmingen	53-6.7	Rata
Anti-CD8-SPRD ¹	Southern Biotech	53-6.7	Rata
Anti-CD19-PE ⁴	Pharmingen	1D3	Rata
Anti-CD25-PE ⁴	Pharmingen	PC61	Rata
Anti-CD44-PE ⁴	Pharmingen	IM7	Rata
Anti-CD62L-FITC ³	Pharmingen	MEL-14	Rata
Anti-CD69-PE ⁴	Southern Biotech	H1.2F3	Rata
Anti-FAS-L-Biotina	Pharmingen	KAY-10	Ratón
Anti-FAS-PE ⁴	Pharmingen	Jo2	Hamster
Anti-FoxP3-FITC ³	EBioscience	FJK16S	Rata
Anti-IgG-FITC (H+L) ³	Southern Biotech	-----	Cabra
Anti-Thy1.2-FITC ³	Pharmingen	53-2.1	Rata
Anti-Thy1.2-PE ⁴	Pharmingen	53-2.1	Rata

(1) Rojo espectral; (2) APC: Aloficocianina; (3) FITC: Isocianato de fluoresceína; (4) PE: Ficoeritrina.

El análisis de los experimentos fue realizado en un FACSCalibur, utilizando el programa de análisis Cell Quest (ambos de Becton Dickinson, Mountain View; CA) .

En algunos experimentos los marcajes *in vitro* para CD25 se combinaron con el marcaje intracelular para FoxP3. En todos los casos las células CD25⁺ resultaron negativas para FoxP3. El marcaje intracelular para FoxP3 se realizó utilizando la aplicación comercial, anti-mouse/rat FoxP3 FITC intracelular Kit (E Bioscience).

Tabla II: Relación de anticuerpos utilizados para el marcaje de células humanas.

ANTICUERPO	CASA COMERCIAL	CLON	ESPECIE
Anti-CD 3-FITC	Coulter	UCHT 1	Ratón
Anti-CD 3-PE	Imm unotech	UCHT 1	Ratón
Anti-CD 4-FITC	Imm unotech	13B8.2	Ratón
Anti-CD 4-PE	Coulter	13B8.2	Ratón
Anti-CD 8-FITC	Imm unotech	B9.11	Ratón
Anti-CD 8-PE	Imm unotech	B9.11	Ratón
Anti-CD 25-PE	Imm unotech	B1.49.9	Ratón

Con el objetivo de limitar el análisis sólo a células vivas, en algunos experimentos el marcaje extracelular se completó añadiendo 2 μ l de Ioduro de Propidio (IP) (DNA-Prep regent Kit, Beckman Coulter), el cual se incorpora sólo a las células muertas.

6. Ensayos Bioquímicos

6.1 Western Blot

Los extractos proteicos se obtuvieron lisando las células T vivas, purificadas a partir de los cultivos celulares mediante centrifugación en un gradiente de densidad con Ficoll-Hypaque (2000rpm, 20min), con tampón de lisis compuesto por Tris HCl 50mM pH7,4 con 1% NP-40, 10 μ g/ml leupeptina, 10 μ g/ml de aprotinina, 1mM de PMSF, 1mM de Ortovanadato.

Las concentraciones proteicas de los extractos obtenidos se determinaron mediante el método Bradford. La misma cantidad de proteína de cada muestra se diluyó en tampón de carga para electroforesis (Tris-HCl 25mM pH 6,8, SDS 3%, Glicerol 10%, azul de bromofenol). Las muestras se resolvieron mediante electroforesis en condiciones reductotas (SDS-PAGE) y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad). Para la transferencia se utilizó un tampón compuesto por 25mM Tris pH 8,3 con 190mM glicina y 20% metanol. Tras esto, para minimizar uniones inespecíficas, las membranas fueron bloqueadas durante 1 h a temperatura ambiente con tampón TBS (150mM NaCl, 20mM Tris-HCl pH 7,4) con 5% de leche desnatada (o BSA) y 0,05% Tween 20. Las proteínas de interés fueron detectadas mediante quimioluminiscencia (según las indicaciones de la aplicación comercial ECL, Amersham) tras la incubación secuencial con los anticuerpos primarios específicos (Ver tabla III) y los secundarios apropiados conjugados con peroxidasa (Dako citomation, Dinamarca).

Tabla III: Relación de anticuerpos utilizados para Western Blot.

ANTICUERPO	CASA COMERCIAL	ESPECIE
Anti- B-actina	Sigma	Ratón
Anti-Caspasa-8	Alexis Biochemicals Corporation	Rata
Anti-Ciclina A	Upstate	Ratón
Anti-Ciclina D3	Pharmigen	Conejo
Anti-Ciclina E	Santa Cruz Biotechnology	Ratón
Anti-CDK2	Santa Cruz Biotechnology	Conejo
Anti-ERK	Cell Signalling Technology	Conejo
Anti-f-ERK	Cell Signalling Technology	Ratón
Anti-FADD	Medical & Biological Laboratories	Ratón
Anti-FLIP	Medical & Biological Laboratories	Conejo
Anti-IkB α	Cell Signalling Technology	Conejo
Anti-f- IkB α	Cell Signalling Technology	Ratón
Anti-p16	Santa Cruz Biotechnology	Conejo
Anti-p19	Santa Cruz Biotechnology	Ratón
Anti-p21	Santa Cruz Biotechnology	Cabra
Anti-p27	Medical & Biological Laboratories	Ratón

6.2 Medida de actividad quinasa CDK2

6.2.1 Inmunoprecipitación de CDK2

Las células T fueron lisadas en tampón de lisis compuesto por Tris HCl 50mM pH 7,5 con 150mM NaCl, 1mM de NaF, 1mM de Ortovanadato, 0,5% de NP-40, 10 μ g/ml leupeptina, 10 μ g/ml de aprotinina, y 1mM de PMSF. Tras la lisis, se incubaron 200 μ g de proteína con 5 μ g de anticuerpo anti-CDK2 (sc-163, Santa Cruz Biotechnology), toda la noche a 4C°. Tras este paso, el inmunoprecipitado fue capturado incubando las muestras con proteína A Sepharosa durante una hora a 4C°. Tas la incubación con proteína A, el exceso proteico no unido al complejo fue eliminado lavando tres veces con el tampón de lisis antes descrito y tres veces con tampón quinasa (descrito a continuación).

Para la realización de los experimentos se utilizaron células T vivas, purificadas a partir de los cultivos celulares mediante centrifugación en un gradiente de densidad con Ficoll-Hypaque (2000rpm,20min).

6.2.2 Ensayo Quinasa para CDK2

El inmunoprecipitado obtenido se incubó, durante 7 minutos a 30°C, con el sustrato de la reacción quinasa [Histona-H1 (Boeringer)] y $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP disueltos en tampón quinasa (20mM Tris-HCl pH 8, 10mM MgCl_2 , 1mM EGTA, 1mM DTT, 1mM NaF, 1mM ortovanadato, 10 $\mu\text{g/ml}$ leupeptina, 10 $\mu\text{g/ml}$ de aprotinina, y 1mM de PMSF). Tras la incubación, las muestras fueron hervidas (100°C, 5min), disueltas en tampón de carga electroforética y resueltas por SDS-PAGE en un gel de acrilamida al 12%. La detección de la radioactividad incorporada al sustrato, a consecuencia de la reacción quinasa catalizada por la CDK2, fue realizada mediante el velado de una película radio sensible.

6.3 EMSA

Para la obtención de los extractos nucleares, las células T fueron primero lisadas en Tampón A (Ver Tabla), 5min a 4°C. El resultado de la lisis fue centrifugado (6500rpm, 6min) y el sobrenadante obtenido (extractos citoplasmáticos) fue retirado y conservado. Los restos celulares decantados (conteniendo los núcleos celulares) fueron lavados con Tampón B (Ver tabla), 6500rpm, 6min. Tras retirar el sobrenadante, la lisis se completo incubando con Tampón C durante 30min a 4°C en agitación.

Tabla IV: Descripción de tampones empleados en la obtención de extractos nucleares.

REACTIVO	TAMPÓN A	TAMPÓN B	TAMPÓN C
Hepes pH 8.0	10mM	10mM	10mM
NaCl	50mM	50mM	350mM
Sacarosa	0,5mM	-----	-----
EDTA pH 8.0	1mM	0,1mM	0,1mM
Espermidina	0,5mM	0,5mM	0,5mM
Espermina	0,15mM	0,15mM	0,15mM
Tritón X-100	0,5%	-----	-----
Glicerol	-----	25%	25%
PMSF	1mM	1mM	1mM
Leupeptina	0,5 g/ml	0,5 g/ml	0,5 g/ml
Pepstatina	0,5 g/ml	0,5 g/ml	0,5 g/ml
Aptotinina	0,2U/ml	0,2U/ml	0,2U/ml
β -Mercaptoetanol	7mM	7mM	7mM

Los extractos nucleares obtenidos (2-5 μg) se incubaron, a 25°C durante 20 min, con 0,07 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de poly (dI-dC), 1 μl de sonda marcada con ^{32}P (100.000-2000.000cpm) y BSA 0,45 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, en un volumen final de 20 μl de tampón de unión (glicerol 20%, MgCl_2 1M, EDTA 0,5M, DTT 1M, NaCl

2M, Tris HCl pH7,5 5%). La sonda de doble cadena utilizada (5'AGTTGAGGGGACTTTCCC AGGC-3, Promega) contiene los sitios de unión específicos para NF- κ B. Tras la incubación con la sonda marcada, los extractos se resolvieron mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida al 6%¹²³. La detección de la radioactividad incorporada fue realizada mediante el velado de una película radio sensible. Como control de carga se utilizó la sonda 5'- TCGACAACCTCATCAC CTATTGCTATAAAATCATAAGG-3' que contiene sitios de unión específicos para el factor de transcripción NF-Y¹²⁴.

Para la realización de los experimentos se utilizaron células T vivas, purificadas mediante centrifugación en un gradiente de densidad con Ficoll-Hypaque.

6.4 Medida de longitud telomérica

Para la realización del experimento, las células T en cultivo fueron paradas en metafase mediante el tratamiento con colcemida 10mM (Kariomax, Gibco) durante 2 h a 37C°. Finalizado el tratamiento, se añadió Na-citrato (0,03M) lentamente sobre las células. Tras 25min de incubación a 37 C°, las muestras se centrifugaron (800rpm, 8min), se retiró el sobrenadante y se incorporó, gota a gota, el fijador. Una vez obtenidas las muestras de células T fijadas en metafase, la determinación de la longitud telomérica fue realizada mediante la técnica de Q-FISH¹²⁵ (del inglés, Qauatitative Fluorescence *in situ* Hybridization). La técnica utiliza una sonda de oligonucleótidos PNA (del inglés, Peptide Nucleic Acid) con una secuencia complementaria al telómero (C₃TA₂)₃ marcada con Cy-3, para su uso en microscopía de fluorescencia (Perkin Elmer). Para la hibridación se depositaron dos gotas de la suspensión celular sobre un portaobjetos y se dejaron secar toda la noche. Una vez secos, se lavaron con PBS y se fijaron con formaldehído al 4% en PBS durante 2min. Tras la fijación, las muestras se lavaron de nuevo con PBS y se trataron con pepsina 1mg/ml disuelta en agua destilada a pH2 (Sigma) durante 10min a 37C°, para eliminar los restos de proteicos y de membrana. Finalizada la digestión, los portas se lavaron de nuevo con PBS, se volvieron a tratar con formaldehído al 4% en PBS durante 2min y tras un lavado con PBS, se deshidrataron secuencialmente en etanol al 70%, 90% y 100%. Después de dejar secar los portaobjetos a temperatura ambiente 10min, se añadieron 2 gotas de 15 μ l de la solución de hibridación (10mM Tris pH7,2, 70% Formamida desionizada (Fulka), 0,5% Boehringer Mannheim Blocking Reagent, 0,3 μ g de la sonda fluorescente PNA-tel-Cy3 y 5% de tampón de Mg, con 25mM de MgCl₂, 9mM ácido cítrico y Na₂HPO₄ 82mM). Tras desnaturalizar las muestras durante 3min en una placa caliente a 80C°, se incuban durante 2h a temperatura ambiente y en oscuridad para completar la hibridación. Finalizada la hibridación, los portas se lavaron dos veces (15min) con Solución I (70% formamida, 10mM Tris pH7,2 y 0,1% BSA) y tres veces en Solución II (0,1M Tris, 0,15M NaCl. 0,08% Tween 20) durante 5min. Tras los lavados, las muestras se deshidrataron, se secaron y se montaron con dos gotas de 10 μ l de medio de montaje Vectashield H-1200 (Vector Laboratories, Burlingame. CA; USA). La captura de imágenes se realizó en un microscopio de fluorescencia Leica DMRB (Leica Microsystems,

Hedielberg) con objetivos de inmersión Planfluor de 100x y con filtros específicos para Cy2 y DAPI. La toma de imágenes correspondientes a la señal telomérica (Cy3) y al cromosoma (DAPI) se hizo con el programa Leica Q-FISH. Se analizaron 15 metafases de tres cultivos independientes en cada experimento. El análisis de la intensidad de fluorescencia telomérica se realizó con el programa TFL-TELO. La longitud telomérica en Kilobases se determinó a partir de los valores de fluorescencia absoluta obtenidos ¹²⁵.

6.5 Medida de actividad Telomerasa

6.5.1 Obtención de extractos S-100

Los extractos celulares se obtuvieron a partir de células T CD4⁺ en cultivo a los tiempos indicados. Tras lavar las células con PBS frío, se resuspendieron en solución de lisis (10mM Tris-HCl pH7,5, 1mM MgCl₂, 1mM EGTA, 0,5% CHAPS, 10% Glicerol, 5mM β-Mercaptoetanol, 0,1 mM PMSF y una mezcla comercial de inhibidores de proteasas (Sigma)) y se incubaron 30min en hielo. Finalizada la lisis, se centrifugaron las muestras y el sobrenadante recogido se congeló rápidamente en N₂ líquido y se guardó a -80C°. La concentración de proteína de los extractos obtenidos se cuantificó mediante el método colorimétrico comercial Bio-Rad DC Proteín Assay (bioRad).

6.5.2 Ensayo de actividad Telomerasa

Para medir la actividad telomerasa se utilizó un protocolo modificado del ensayo TRAP¹²⁶ (Telomere Repeat Amplification protocol). El ensayo consta de una primera fase en la que se produce la extensión del oligonucleótido sustrato de la telomerasa y un segundo paso en el que se amplifican las extensiones teloméricas añadidas en la primera fase.

En la primera fase del experimento, se incubó la proteína obtenida en los extractos S-100 (0,01-1μg) con el oligo sustrato de la telomerasa (5'-AATCCGTCGAGCAGAGTT-3')(Oligo TS, 1μM) durante 1 h a 30C° en presencia de solución de extensión (50mM Tris-acetato pH8,5, 50mM acetato potásico, 3mM MgCl₂, 1mM espermidina, 1mM EGTA y 5mM β-Mercaptoetanol) y de una mezcla de nucleótidos dATP/dGTP/dTTP a una concentración de 33,3mM cada uno. Como control negativo se utilizó el mismo procedimiento pero la muestra proteico fue pe-tratada con 1μg de Rnasa libre de Dnasa (Roche) durante 10min.

En la segunda fase del ensayo las repeticiones teloméricas se detectaron por PCR. Se utilizaron los oligos TS marcados con [³²P] y Anchor (5'-GCG CGG CTAACC CTAACC CTAACC-3') para amplificar las repeticiones añadidas por la telomerasa contenida en los extractos S-100 durante la primera fase del ensayo. El tampón de PCR se substituyó por el tampón TRAP (20mM Tris-HCl pH 8,3, 68mM Kcl, 1,5mM MgCl₂, 1mM EGTA y 0,05% Tween 20) Los productos de PCR se separaron por electroforesis en un gel desnaturizante (7M de Urea) de

poliacrilamida al 8%, 1h a 810V. La cuantificación de la radioactividad fue realizada utilizando Storm PhosphorImager y el software ImageQuant (ambos de Molecular Dynamics, Little Chalfont, Bucks, UK) o con el software NIH Image v.1.62.

6.6 Medida de actividad caspasa

La actividad caspasa inducida tras la segunda estimulación fue medida con la aplicación comercial DEVD-Rhodamina (promega), según las instrucciones del fabricante. La actividad caspasa fue medida en células T control y *lpr* a las 0 h y 24 h tras la segunda estimulación.

7. Análisis Serológicos e Histológicos

7.1 Detección de anticuerpos anti-DNA en suero

La detección relativa de los niveles en suero de anticuerpos anti-ADN de doble cadena, fue realizada mediante una técnica convencional de ELISA tipo sandwich (del inglés abreviado, *Enzyme linked immunosorbent assay*). Para la captura de los anticuerpos en suero se tapizaron placas de 96 pocillos con ADN desnaturalizado de timo de ternero (Sigma Aldrich), 150 μ l por pocillo a razón de 2,5 μ g/ml. Para la detección de IgG se utilizó un anticuerpo anti-Mouse conjugado con peroxida (Jackson Immuno Research, Best Grove, PA). Los niveles relativos de absorbancia fueron medidos en un dispositivo Labsystems Multiskan Plus Plate Reader, a 492nm.

7.2 Inmunofluorescencia en criocortes de riñón

Tras el sacrificio, los riñones extraídos son congelados individualmente, en Nitrógeno líquido, embebidos en solución de inclusión (Jung Tissue Freezing médium, Leica Microsystems). Los criocortes se realizaron en un criostato (Leica CM1900) a 7 μ m de espesor, las secciones fueron recogidas en portas Fischer (Fisherbrand Superfrost/Plus) y se dejaron secar a temperatura ambiente durante 2 h. Tras el secado, los cortes se tratan, a 4C°, con Acetona a -20C° durante 10min. Tras la fijación con acetona las muestras se dejan secar durante 30min. A continuación se bloquean los cortes, con PBS suplementado con un 2% de BSA y un 10% de suero de cabra, durante 1h a temperatura ambiente. Para retirar el exceso de solución bloqueante, los cortes se lavan tres veces con PBS (5min cada lavado), posteriormente se incuban, durante 1h a temperatura ambiente, con el anticuerpo específico conjugado con un fluoróforo adecuado (ver Tabla IV). Una vez incubados, los cortes se lavaron tres veces con PBS, y se montaron con medio de montaje Vectashield H-1200 (Vector Laboratories). La tinción fue evaluada en microscopio de fluorescencia Leica.

Tabla V: Relación de anticuerpos utilizados para Inmunofluorescencia.

ANTICUERPO	CASA COMERCIAL	CLON	ESPECIE
Anti IgG-FITC (H+L)	Pharmingen	-----	Cabra
Anti CD4-PE	Pharmingen	RM 4-5	Rata
Anti Thy1.2-FITC	Pharmingen	53-2.1	Rata
Anti F4/80-FITC	Serotec	A3-1	Ratón

7.3 Evaluación de Glomerulonefritis

El grado de glomerulonefritis fue evaluado en cortes parafinados de riñón. La gravedad de la afectación glomerular se clasificó del 0 al 4, según la escala de Berden¹²⁷ [(0), sin daño; (1), aumento mínimo del mesanglio; (2), aumento medio del mesanglio con inflamación glomerular; (3) aumento del mesanglio, inflamación glomerular y adhesiones capsulares; (4) alteración de la arquitectura glomerular superior al 70%, formación de cilindros tubulares]. Los resultados de la evaluación fueron confirmados por la Doctora. Juana Flores, del Departamento de Biología animal de la Facultad de Veterinaria (Universidad Complutense de Madrid).

7.4 Cuantificación del nivel de proteína en orina

El nivel de proteína en la orina de los ratones fue evaluado utilizando las tiras reactivas Urispec GP + A strips (Henry Ssheim, Port Washington; New York), según las indicaciones del fabricante.

8. Estadística

El valor *P* para todos los análisis estadísticos se obtuvo aplicando el Test de la T de Student. Los valores $P < 0,05$ se consideran estadísticamente significativos.

VI. RESULTADOS

“Despite over a decade of study of FAS, the source and explanation for the accumulating T cells in lpr mice remain a mystery”

Karen A.Fortener and Ralph C.Budd. **The Journal of Immunology**, 175:4374-4382; **2005**

1. Breve introducción a la enfermedad autoinmune asociada al fenotipo *lpr*

Desde que en 1977 se definió el fenotipo *lpr*, estos ratones se han convertido en uno de los modelos experimentales de referencia en el estudio de las patologías asociadas al desarrollo de procesos autoinmunes. El fenotipo asociado a la expresión defectuosa de FAS es un compendio de múltiples manifestaciones patológicas multisistémicas y graves alteraciones inmunológicas. Aunque la severidad de la enfermedad es dependiente del fondo genético de los ratones, ciertos rasgos autoinmunes se mantienen como marcas identificativas del modelo *lpr*.

Como punto de partida de nuestro trabajo hemos caracterizado las principales afectaciones inmunológicas de los ratones *C57BL/6-lpr* (en adelante *lpr*). Los resultados que se muestran a continuación han sido cualitativamente similares a los obtenidos al estudiar los ratones *lpr* en fondo MRL, con la salvedad de que en estos ratones, la severidad de la enfermedad autoinmune es cuantitativamente mayor.

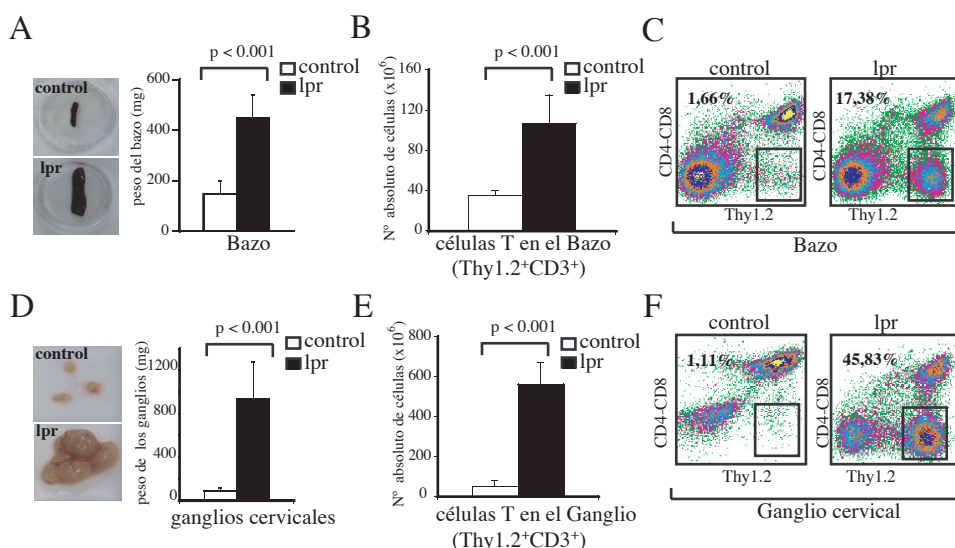


Figura 1. Hiperplasia de los órganos linfoides secundarios en los ratones *C57BL/6-lpr*. (A) Bazos representativos procedentes de ratones control (*C57BL/6*) y *lpr* (*C57BL/6-lpr*) hembras de 6 meses de edad, panel izquierdo. Panel derecho, promedio de peso (en mg) de los bazos de ratones control y *lpr* (hembras de 4-6 meses de edad) (los valores representan la media \pm Desviación estándar (DS), $n=10$, $p<0.001$). (B) Número absoluto de células T (definidas como Thy1.2^+) en el bazo de ratones control y *lpr* (hembras de 4-6 meses) (los valores representan la media \pm DS, $n=10$, $p<0.001$). (C) Porcentaje de células T dobles negativas (definidas por citometría de flujo mediante marcaje en 4 colores como $\text{Thy1.2}^+\text{CD4}^-\text{CD8}^-\text{B220}^+$) en el bazo procedente de ratones control y *lpr* hembras de 4-6 meses de edad (se muestra un experimento representativo). (D) Ganglios linfáticos representativos (panel izquierdo) y promedio de peso (panel derecho) de ganglios linfáticos cervicales procedentes de ratones control y *lpr* hembras de 6 meses de edad (los valores representan la media \pm la DS, $n=10$, $p<0.001$). (E) Número absoluto de células T en los ganglios linfáticos cervicales de ratones control y *lpr* (hembras de 4-6 meses) (los valores representan la media \pm DS, $n=10$, $p<0.001$). (F) Porcentaje de células T dobles negativas en los ganglios linfáticos cervicales control y *lpr* hembras de 6 meses de edad (se muestra un experimento representativo)

1.1 Hiperplasia de los órganos linfoides secundarios en los ratones *lpr*.

Uno de los rasgos más sobresalientes y llamativos que surge tras la necropsia de los ratones *lpr*, es la hiperplasia de los órganos linfoides secundarios. A partir de los tres meses de edad, los ratones deficientes en FAS presentan un aumento de tamaño muy significativo, tanto del bazo (esplenomegalia) (Fig.1A), como de los ganglios linfáticos (adenopatía) (Fig.1D). En nuestro trabajo hemos analizado los ganglios cervicales como ganglios linfáticos representativos.

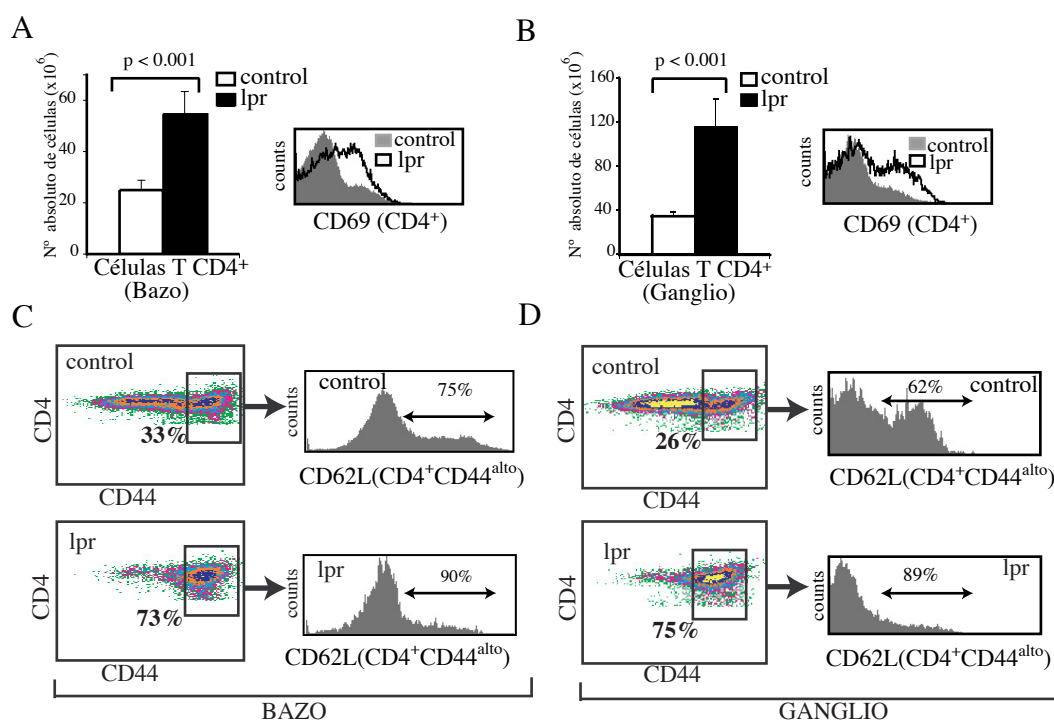


Figura 2. Acumulación de células T CD4⁺ de memoria en los ratones *lpr*. (A) Número absoluto de células T CD4⁺ en el bazo de ratones control y *lpr* hembras de 4-6 meses de edad (panel izquierdo) (los valores representan la media \pm DS, n=10, p=0,0001); panel derecho, perfil de expresión por citometría de flujo de CD69 en la población de células T CD4⁺ en el bazo de los ratones control y *lpr* hembras de 4-6 meses de edad (se muestra un experimento representativo). (B) Número absoluto de células T CD4⁺ (panel izquierdo) en los ganglios linfáticos cervicales de ratones control y *lpr* hembras de 4-6 meses de edad (los valores representan la media \pm DS, n=10, p=0,001); panel derecho, perfil de expresión de CD69 en la población de células T CD4⁺ (se muestra un experimento representativo). (C) Porcentaje de células T CD4⁺ de memoria (definidas por citometría de flujo mediante marcaje en 3 colores como CD4⁺CD44^{alt}CD62L⁻) dentro del total de la población de células T CD4⁺ del bazo de ratones control y *lpr* hembras de 4-6 meses (se muestra un experimento representativo). (D) Porcentaje de células T CD4⁺ de memoria dentro del total de la población de células T CD4⁺ de los ganglios linfáticos cervicales de ratones control y *lpr* hembras de 4-6 meses (se muestra un experimento representativo)

1.1.1 Acumulación de células T Doble Negativas y células T CD4⁺ de memoria en los órganos linfoides secundarios de los ratones *lpr*.

A nivel celular, la esplenomegalia y adenopatía de los ratones *lpr* tiene su origen en una acumulación anormal de células T (Fig.1B y 1E, respectivamente) y células B (Fig.3A) (definidas por citometría de flujo como Thy1.2⁺ y B220⁺CD19⁺Thy1.2⁻, respectivamente).

La acumulación de células T está caracterizada por la expansión de un fenotipo poco corriente de células T conocido como células T dobles negativas (abreviado DN). Por citometría de flujo estas células se definen como CD3⁺Thy1.2⁺B220⁺CD4⁻CD8⁻ (Fig.1C y 1F). La aparición de esta población aberrante es una de las marcas diagnósticas más características de la enfermedad asociada a los defectos en la ruta de señalización de FAS, tanto en los modelos en ratón, como en las patologías humanas.

Otro de los rasgos más llamativos, en cuanto a la composición de la población de células T de los ratones *lpr*, es la acumulación de células T CD4⁺ (Fig.2A y 2B, panel izquierdo) y en especial, el alto porcentaje que, dentro de estas, suponen las células activadas (definidas como CD4⁺CD69⁺), tanto en el bazo, como en los ganglios linfáticos (Fig.2A y 2B, panel derecho). Además, por citometría de flujo, la población de células T CD4⁺ presenta unas características fenotípicas (CD4⁺CD44^{alto}CD62L^{bajo}) que la definen como células T de memoria (Fig.2C y 2D).

1.1.2 Acumulación de células B IgG^{alto} en los ganglios linfáticos de los ratones *lpr*.

En una respuesta inmunitaria, la interacción del antígeno con las Igs de membrana específicas en los linfocitos B maduros, inicia la respuesta de anticuerpos. Esta interacción dispara la cascada de señalización intracelular, que estimula a las células B en reposo para entrar en el ciclo celular y aumentar la carga coestimuladora. Los antígenos proteicos son endocitados y procesados por las células B y los péptidos derivados de estos antígenos, son presentados a los linfocitos T CD4⁺ en la membrana en asociación con moléculas del MHC de clase II. Tras el reconocimiento específico del antígeno, la interacción de las células T activadas con las células B, en los centros germinales de los folículos linfoides, estimula el cambio de isotipo de cadena pesada de la Ig de membrana y el aumento de la secreción de inmunoglobulinas. En los ganglios linfáticos de los ratones *lpr*, en paralelo con la hiperactivación de células T CD4⁺, hemos detectado un alto porcentaje de células B IgG^{alto} en comparación con los ratones control (Fig.3B), lo que indica una interacción efectiva entre las células B y T CD4⁺ activadas.

Así pues, la acumulación de células en los ratones *lpr* podría definirse como un acúmulo dinámico, ya que no sólo vemos un incremento progresivo en el número de células T y B, sino también un sesgo hacia la aparición de fenotipos propios de estados de activación inmunológica.

1.2 La hiperactivación del Sistema Inmunológico en los ratones *lpr* da lugar al desarrollo de autoinmunidad

Una de las consecuencias directas de la hiperactivación inmunológica, es la presencia en el suero de los ratones *lpr*, de altos títulos de anticuerpos específicos contra antígenos nucleares. A los seis meses de edad detectamos, mediante ELISA (del inglés abreviado, *enzyme linked immunosorbent assay*), altos niveles de IgG anti-ADN de doble cadena en el suero de las hembras *lpr* en comparación con hembras control (Fig.3C). Aunque el ADN es muy poco inmunógeno y no puede activar *per se* a la célula T, se ha propuesto que forma complejos con proteínas nucleares. Estos complejos de proteína y ADN procedentes de restos de células apoptóticas o necróticas son reconocidos y procesados por las células B. En un contexto de autoinmunidad, el tandem ADN-péptidos propios presentado a la célula T auto-reactiva es suficientemente inmunogénico como para permitir su activación. Como consecuencia, la célula T proveerá a la célula B de la señal necesaria para que se produzca el cambio de isotipo.

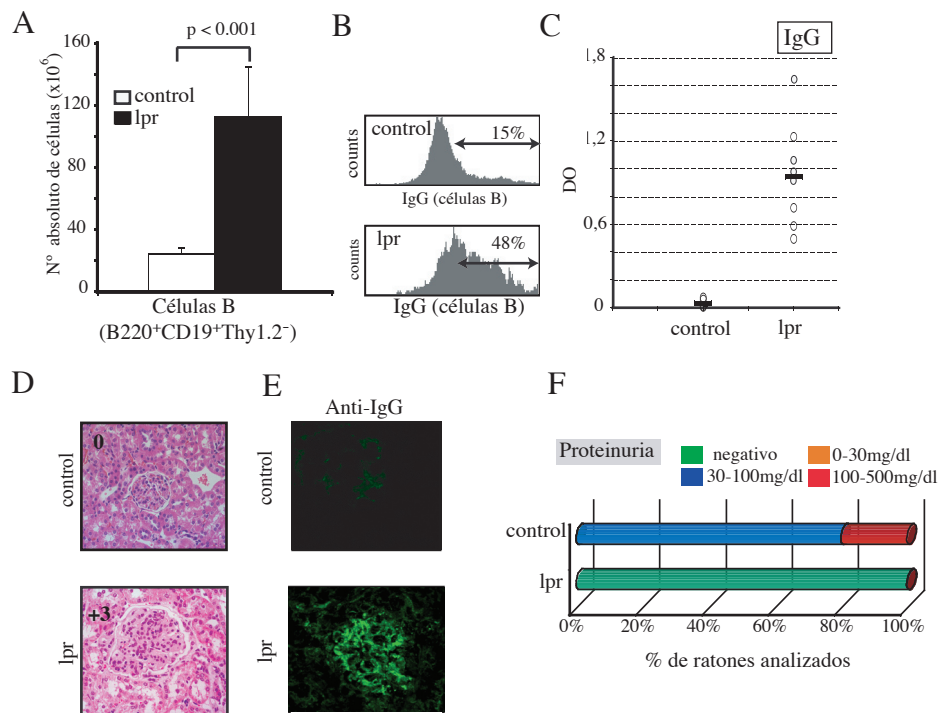


Figura 3. Glomerulonefritis autoinmune en ratones *lpr*. (A) Número absoluto de células B (definidas por citometría de flujo como B220⁺CD19⁺Thy1.2⁺) en los ganglios linfáticos cervicales de ratones control y *lpr* hembras de 4-6 meses de edad (los valores representan la media \pm DS, n=9, p<0,001). (B) Perfil de expresión por citometría de flujo de IgG en la población de células B de los ganglios linfáticos cervicales de ratones control y *lpr* hembras de 4-6 meses de edad (se muestra un experimento representativo). (C) Niveles séricos relativos de IgG anti-ADN detectados mediante ELISA en el suero de ratones control y *lpr* hembras de 4-6 meses de edad (n=8, p <0,05). (D) Secciones de glomérulos representativas de ratones control y *lpr* hembras de 6 meses de edad. Los glomérulos *lpr* presentan inflamación glomerular, aumento del mesanglio y adhesiones capsulares (grado +3 en escala de Berdem). (E) Inmunofluorescencia en criocortes de riñón procedentes de ratones control y *lpr* con anticuerpos anti-IgG (hembras de 6 meses de edad). Se muestra un experimento representativo. (F) Evaluación de la presencia de proteína en la orina de ratones control y *lpr*.

Los altos niveles de auto-anticuerpos IgG de los ratones *lpr* adquieren relevancia funcional en una de las manifestaciones patológicas asociadas al fenotipo de los ratones deficientes en FAS, la inflamación y destrucción glomerular. La nefritis autoinmune es atribuida al depósito de inmunocomplejos (compuestos de ADN y antígenos nucleoproteicos propios) y anticuerpos específicos, usualmente IgG. En las respuestas inmunitarias normales las funciones protectoras conferidas por los anticuerpos tienen su origen en la neutralización del antígeno, la activación del sistema del complemento y el reclutamiento de células inflamatorias al foco de respuesta. La misma secuencia efectora implicada en la respuesta protectora es responsable de los efectos anatómo-patológicos negativos asociados al depósito anormal de anticuerpos en condiciones de autoinmunidad. En el lugar de depósito de auto-anticuerpos se produce el reclutamiento y activación de células inflamatorias.

El análisis patológico de secciones en parafina de los riñones de ratones *lpr* y control, revelan una inflamación glomerular, con aumento del mensangio y adhesiones capsulares (grado 2+/3+ en la escala de Berden; ver Material y Métodos), patente en los *lpr* a partir de los seis meses de edad (Fig.3D). La presencia de depósitos de anticuerpos IgG en los glomérulos de los ratones *lpr* fue confirmada mediante inmunofluorescencia en criocortes de riñón (Fig.3E). Esta situación inflamatoria mantenida en el tiempo tiene como consecuencia la desestabilización estructural del glomérulo, la consecuente pérdida de proteína en orina (Fig.3F) y en último término, el completo fracaso renal y la muerte.

La enfermedad de los ratones *lpr* se asocia a una profunda alteración de la homeostasis del Sistema Inmunológico con graves consecuencia patológicas. Quisimos profundizar en las consecuencias que, además de la resistencia a apoptosis, tenía la falta de FAS sobre las características intrínsecas de activación y proliferación de las células T y su posible efecto en el desarrollo de autoinmunidad.

2. Estudio de las características proliferativas de las células T deficientes en FAS

Para estudiar las características proliferativas de las células T deficientes en FAS hemos diseñado un protocolo de activación repetida *in vitro* de células T. Este protocolo está basado en los modelos experimentales establecidos de inducción de muerte por activación, AICD (ver Introducción). Tras la purificación por selección negativa de las células T CD4⁺ o CD8⁺, procedentes de ratones *lpr* (C57Bl/6-*lpr*) o control (C57BL/6), estas eran sometidas a un primer módulo de activación *in vitro* de tres días de duración con Concanavalina-A (Con A) + IL-2 recombinante (γ IL-2), o anti-CD3 + γ IL-2. Después de esta primera estimulación, las células se expandían durante seis días con γ IL-2. Tras este periodo de expansión, las células T pre-activadas se re-estimulaban de nuevo durante tres días (estimulación secundaria).

En algunos experimentos el módulo de activación-expansión-activación se repitió hasta ocho veces, alcanzando hasta octavas estimulaciones (esquema en Fig.4A). Este protocolo pretende simular lo que ocurre cuando las células T autorreactivas están presentes en un microambiente con alta carga de autoantígenos específicos, donde la probabilidad de reencontrarse reiteradamente con un antígeno propio es muy alta y los niveles de coestimulación bajos. Con el objetivo de estudiar los acontecimientos celulares y moleculares que precedían al desarrollo de la patología autoinmune, hemos utilizado ratones menores de ocho semanas para realizar los experimentos.

2.1 Hiperproliferación de las células T deficientes en FAS tras activación repetida *in vitro*.

Como resultado de la aplicación del protocolo de estimulación repetida, observamos que la deficiencia en FAS no afectaba a la respuesta proliferativa primaria con Con A (Fig.4B). Sin embargo, tras un periodo de expansión con γ IL-2 de seis días, los datos de cuantificación de incorporación de Timidina tritiada (T[H³]) revelaban una notable ventaja proliferativa de las células T CD4⁺ deficientes en FAS tras la estimulación repetida con Con A (Fig.4B). Además, las células T CD4⁺ procedentes de ratones *lpr* soportaban al menos ocho rondas de estimulación con Con A manteniendo una gran intensidad proliferativa, mientras que las células control no soportaban más allá de una tercera estimulación (Fig.4B).

Estudiamos en detalle la cinética de proliferación durante la estimulación secundaria. Observamos que la respuesta proliferativa de las células deficientes en FAS era muy rápida y la ventaja, con respecto a las células T control, evidente ya a las 24 horas (h), alcanzado un pico máximo de proliferación a la 72 h (Fig.4D, panel izquierdo). Cuando analizamos la cinética de la respuesta primaria no encontramos diferencias significativas a ninguno de los tiempos establecidos (Fig.4C, panel izquierdo).

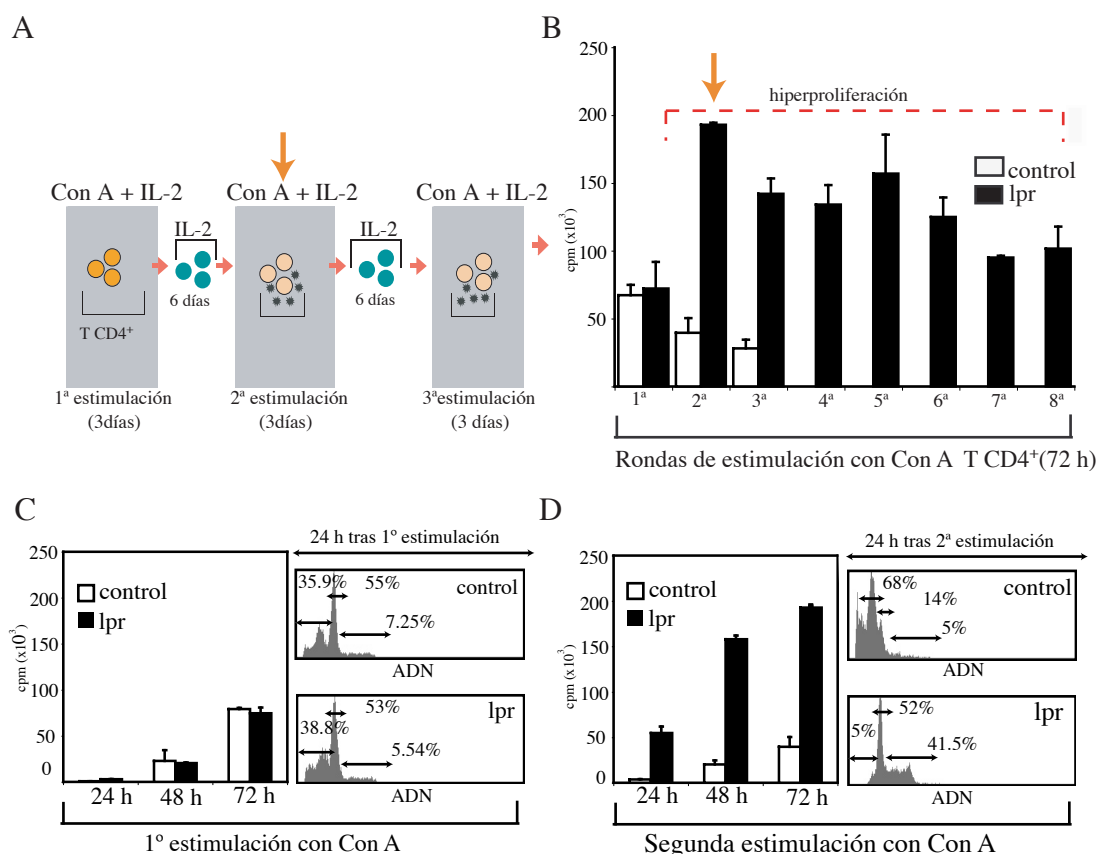


Figura 4. Análisis de las características proliferativas de las células T control y *lpr* en respuesta a la estimulación repetida *in vitro*. (A) Esquema del protocolo de estimulación repetida. 3 días de estimulación primaria - 6 días de expansión con IL-2 - 3 días estimulación secundaria. (B) Respuesta proliferativa de las células T CD4⁺ ante rondas sucesivas de estimulación con Con A (3 µg/ml), cada una separada por un período de expansión con IL-2 de 6 días de duración. Se muestran los valores de incorporación de T[H³] correspondientes a las 16 últimas horas de cada periodo estimulación (los valores representan la media ± DS, n=3) Se muestra un experimento representativo de 5 realizados de forma independiente. (C) Cinética de incorporación de T[H³] durante la estimulación primaria con Con A de las células T CD4⁺ procedentes del bazo de ratones control y *lpr* (izquierda) (los valores representan la media ± DS, n=3); se muestra un experimento representativo de 7 realizados de forma independiente. Análisis del ciclo celular a las 24 h de la primera estimulación (derecha) (se muestra un experimento representativo). (D) Cinética de incorporación de T[H³] durante la estimulación secundaria con Con A de las células T CD4⁺ control y *lpr* (izquierda) (los valores representan la media ± DS, n=3.); se muestra un experimento representativo de 7 realizados de forma independiente. Análisis del ciclo celular a las 24 h de la segunda estimulación (derecha) (se muestra un experimento representativo).

Estudiamos el comportamieto apoptótico de las células T en nuestro protocolo de estimulación repetida. Como era esperable, durante la primera estimulación no fueron detectadas diferencias en la inducción de apoptosis, caracterizada por unos niveles basales de muerte en ambos tipos celulares (Fig.4C, panel derecho). Comprobamos que, durante la estimulación secundaria con Con A, en las células T control la inducción de apoptosis tenía lugar en las primeras horas de cultivo, alcanzando a las 24 h de la segunda estimulación los niveles más altos (Fig.4D, panel derecho). No fue detectada inducción significativa de apoptosis en el caso de las células T *lpr*.

Analizamos por citometría de flujo las características fenóticas de las células T que obteníamos a consecuencia de la aplicación del protocolo de estimulación repetida. Pudimos comprobar que, tanto en células T control como *lpr*, el fenotipo de células T CD4⁺ que obteníamos tras la segunda estimulación (Fig.5) se correspondía con el característico de células de T CD4⁺ de memoria (CD4⁺CD44^{alto}CD62L⁺), el cual se acumula anormalmente *in vivo* en los ratones *lpr* (Fig.2C y 2D). Por tanto, las disparidades proliferativas entre ambos tipos de células no se debían a una alteración en el proceso de diferenciación *in vitro*

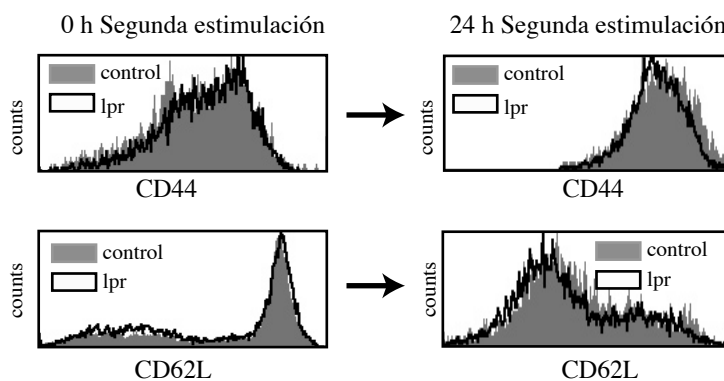


Figura 5. Caracterización fenotípica de las células T CD4⁺ obtenidas *in vitro* a consecuencia de la estimulación repetida con Con

A. Los histogramas muestran los niveles de expresión por citometría de flujo de CD44 (arriba) y CD62L (abajo) en células T CD4⁺ control y *lpr* al final de periodo

de expansión con IL-2 que precede a la estimulación secundaria con Con A (tiempo cero de la segunda estimulación) (izquierda) y a las 24 h de la estimulación secundaria con Con A (derecha). Los datos son representativos de 5 experimentos independientes con resultados similares.

Los mismos resultados proliferativos fueron obtenidos cuando estimulábamos repetidamente células T CD8⁺ (Fig.6A), o utilizábamos anti-CD3 pegado a placa como activador mitogénico (Fig.6B), o no complementábamos el medio IL-2 (dato no mostrado).

Para evitar la posibilidad de que el mantenimiento en cultivo de las células T durante dos semanas generase condiciones artificiales, que tuvieran como consecuencia la selección de ciertos clones deficientes en FAS con alta capacidad proliferativa, diseñamos un protocolo de estimulación repetida en el cual los periodos de estimulación y expansión se acortaron ostensiblemente (esquema en Fig.6C, panel izquierdo). En este protocolo, las células T CD4⁺ aisladas por selección negativa eran sometidas a una corta estimulación primaria con Con A de sólo 24 h, seguida de una expansión con IL-2 también de 24 h. A continuación las células se re-estimulaban de nuevo con Con A (estimulación secundaria). Con este procedimiento, el tiempo de mantenimiento en cultivo previo a la estimulación secundaria se reducía de seis días a 48 h. Bajo estas condiciones, al igual que ocurría en la versión extendida del protocolo de estimulación repetida, tras la activación secundaria, las células T *lpr* mostraban una clara ventaja proliferativa en comparación a las células control (Fig.6C, panel derecho).

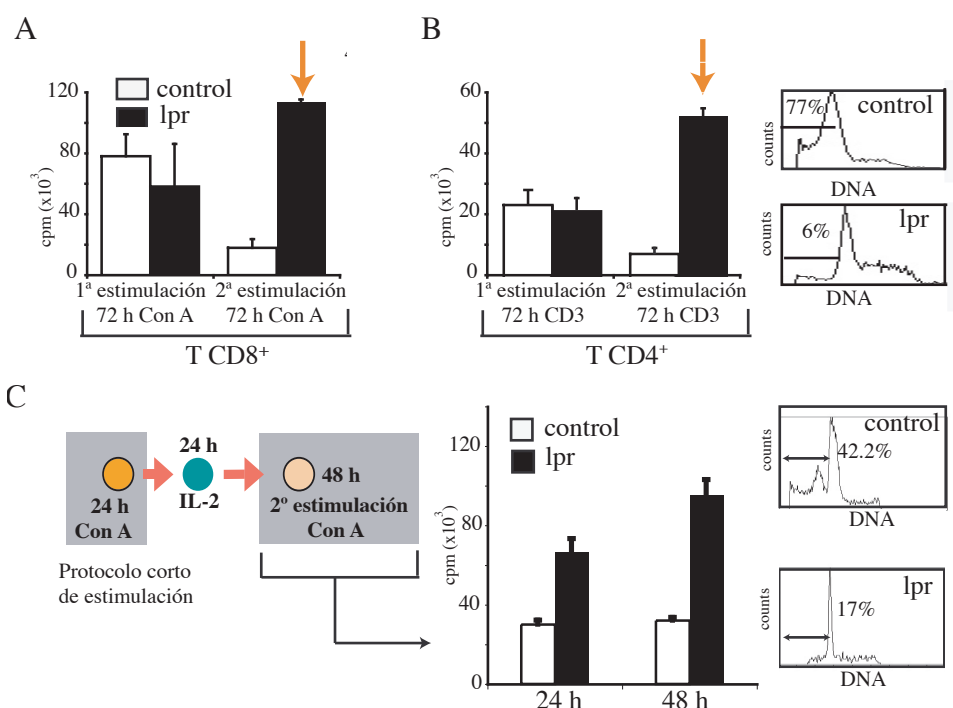


Figura 6. Análisis de las características proliferativas de las células T control y *lpr* en respuesta a la estimulación repetida *in vitro*. (A) Respuesta proliferativa de las células T CD8⁺ control y *lpr*. Se muestran datos de incorporación de T[H³] correspondientes a las últimas 16 h de la estimulación primaria y secundaria con Con A (los valores representan la media ± DS, n=3) Se muestra un experimento representativo de 3 realizados de forma independiente. (B) Respuesta proliferativa de las células T CD4⁺ control y *lpr* estimuladas con anti-CD3 (1 µg/ml, pegado a placa). Se muestran datos de incorporación de T[H³] correspondientes a las últimas 16 h de la estimulación primaria y secundaria con anti-CD3 (los valores representan la media ± DS, n=3) Se muestra un experimento representativo de 3 realizados de forma independiente. (C) Panel izquierdo, esquema que ilustra el protocolo abreviado de estimulación repetida. 24 h estimulación primaria - 24 h días de expansión con IL-2 - 48 h estimulación secundaria. Panel derecho, cinética de incorporación de T[H³] durante las 48 h de la estimulación secundaria con Con A (según el protocolo corto de estimulación repetida) de las células T CD4⁺ control y *lpr* (los valores representan la media ± DS, n=3.) Se muestra un experimento representativo de 4 realizados de forma independiente. Análisis del ciclo celular a las 24 h de la segunda estimulación.

2.2 FAS controla de forma directa la proliferación y expansión de las células T activadas que sobreviven a la inducción de apoptosis.

Nuestros resultados apuntaban a que, en ausencia de FAS, las células T activadas de forma repetida manifestaban una mayor capacidad de división, que se perduraba en el tiempo soportando un elevado número de rondas de estimulación. Sin embargo, ya que FAS actúa como un inductor de apoptosis, estudiamos si la ventaja proliferativa que presentaban las células *lpr in vitro* se debía a un defecto directo en el control de la activación y proliferación de las células T debido a la falta de FAS, o eran, por el contrario, un efecto indirecto ligado a la falta de muerte en el cultivo de las células T *lpr*. En este sentido, el acúmulo de células T resistentes a apoptosis, aún proliferando a un ritmo normal, podría dar como resultado una aparente pero falsa ventaja proliferativa al medirla por incorporación de T[H³].

Marcamos las células con la sonda fluorescente CFSE (del inglés abreviado, 5-, 6-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester). En cada división celular, como consecuencia de la citocinesis, las células que han incorporado el marcador descienden el nivel de intensidad de fluorescencia media hasta la mitad de la intensidad media inicial y esto se puede monitorizar por citometría de flujo. Una mayor pérdida de fluorescencia es indicativo por tanto de un mayor número de divisiones. Combinamos el marcaje con CFSE con un marcaje con Ioduro de Propidio (IP), el cual se incorpora sólo a las células muertas. Este doble marcaje nos permitía monitorizar la pérdida de fluorescencia en una región compuesta exclusivamente por células vivas, eludiendo así el problema de la diferente susceptibilidad a la apoptosis entre células T control y *lpr*. Analizamos la pérdida de intensidad de fluorescencia de las células T CD4⁺ 72 h después del marcaje al inicio de la primera o segunda estimulación con Con A. En concordancia con los datos de incorporación de T[H³], no se detectaron diferencias en la proliferación primaria entre células T control y deficientes en FAS (dato no mostrado). Sin embargo, las células T CD4⁺ deficientes en FAS presentaban, a las 72 h de la estimulación secundaria, un descenso más acusado de la intensidad media de fluorescencia, respecto al marcaje inicial, que las células control (Fig.7A). En el caso de las células *lpr* la caída de fluorescencia representaba una pérdida de $9,2 \pm 0,97$ veces la fluorescencia inicial, frente a las $3,59 \pm 0,14$ veces de pérdida en un control (Fig.7A, panel inferior).

Los datos de CFSE confirmaban que, en ausencia de FAS, las células T CD4⁺ presentaban intrínsecamente un mayor potencial proliferativo, que permitía que cada célula individual se dividiese, en un mismo tiempo, un mayor número de veces que las células T control. Por tanto, FAS parecía ejercer un papel fundamental acotando la capacidad de expansión de las células T que, tras la activación, sobreviven a apoptosis.

Para confirmar el papel de FAS en el control de la proliferación de las células T resistentes a apoptosis, estudiamos, tras 48 h de estimulación secundaria con Con A, el comportamiento proliferativo de las células T supervivientes a apoptosis. A las 48 h, las células T vivas se purificaron mediante centrifugación en un gradiente de Ficoll. Tras ello, se re-estimularon de nuevo con medio fresco con Con A (en las mismas condiciones de concentración celular para ambos tipos celulares) y la proliferación fue medida a las 24 h de la re-estimulación (esquema en Fig.7B). A pesar de que las células *lpr* no se mueren por apoptosis se sometieron también al mismo tratamiento. Bajo estas condiciones hemos observado que, tras la re-estimulación, las células T CD4⁺ deficientes en FAS tienen una gran capacidad de respuesta proliferativa en comparación con las células T control (Fig.7B, panel inferior). Sin embargo, los datos de ciclo celular mostraban niveles basales y comparables de muerte entre ambos tipos celulares. Además, en el caso de las células *lpr*, era evidente un incremento en el porcentaje de células en fase de Síntesis/Mitosis (Fig.7B, panel inferior), indicativo de una mayor proliferación celular.

Esta aproximación nos permitía separar en el tiempo la fenomenología asociada al proceso apoptótico derivado de la señalización por FAS y esta nueva función en el control de la división celular. Así, durante las primeras horas de estimulación, una parte de las células

activadas mueren por apoptosis inducida por FAS. Sin embargo, estos experimentos, junto con los de CFSE, indicaban que FAS ejerce un control posterior fundamental, limitando la capacidad replicativa de las células T supervivientes a la apoptosis,

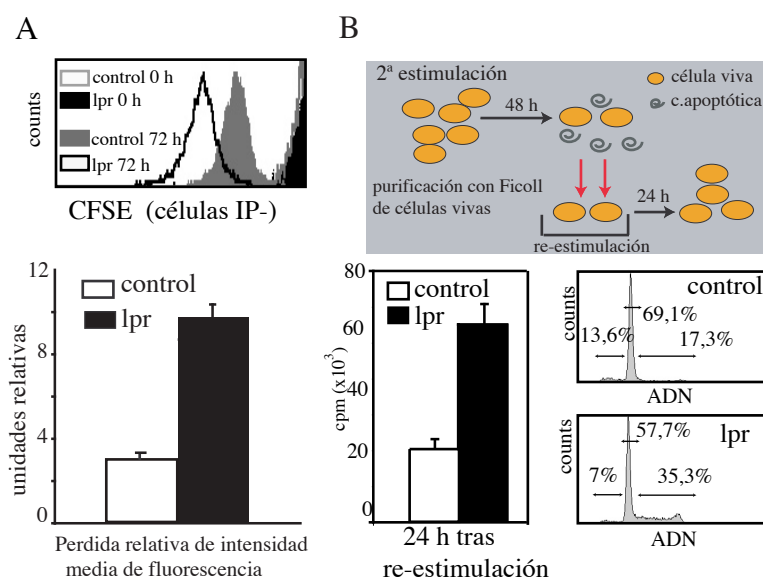


Figura 7. Respuesta proliferativa de células T CD4⁺ control y *lpr* supervivientes a la inducción de apoptosis tras la estimulación secundaria. (A) Pérdida de intensidad de fluorescencia de CFSE en las células T CD4⁺ control y *lpr* tras 72 h de estimulación secundaria con Con A (parte superior). Cuantificación del rango de pérdida de intensidad media de fluorescencia a las 72 h de la

estimulación secundaria con respecto al marcaje inicial a tiempo 0 de la segunda estimulación (parte inferior) (Medía de fluorescencia en un control a las 72 h $546,68 \pm 58,3$ vs $217,19 \pm 20,94$ en un *lpr*; intensidad media inicial en un control 1968 ± 268 , *lpr* 2000 ± 220 ; n=3). Se muestra un experimento representativo de un total de 5. Las células muertas han sido excluidas del análisis combinando el marcaje con CFSE con el marcaje con Ioduro de Propidio (IP), se muestran las células IP⁻. (B) Tras 48 h de estimulación secundaria con Con A, las células T CD4⁺ control y *lpr* vivas fueron purificadas mediante un gradiente de densidad con Ficoll y re-estimuladas de nuevo Con A (esquema en panel superior). En el panel inferior se muestran los datos de incorporación de T[H³] (izquierda) (Los valores representan la media \pm la DS, n=3) y el perfil de ciclo celular a las 24 h de la re-estimulación (derecha) (se muestra un experimento representativo). Los valores son representativos de 4 experimentos independientes con resultados similares.

Una diferencia sustancial entre las células T control y deficientes en FAS radica en la susceptibilidad a la muerte como consecuencia de la activación secundaria.

El proceso apoptótico que se deriva de la interacción de FAS con su ligando tiene como pilar fundamental la activación de una cascada apoptótica dependiente de la activación de caspasas¹⁸. En ausencia de FAS no se activa la cascada apoptótica y por tanto no hay muerte. Para mimetizar las condiciones de falta de muerte que se dan en las células T *lpr*, hemos tratado las células control con el pan-inhibidor de caspasas zVAD (del inglés abreviado, *benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp*). Este péptido tiene la capacidad de unirse de forma específica al centro activo de diferentes caspasas, impidiendo su autoproteólisis y posterior activación^{57,128}.

Mediante tinción de ciclo celular observamos que el tratamiento de las células control con zVAD (50 μ M) tenía como consecuencia una inhibición de la muerte celular inducida tras la activación secundaria, alcanzando niveles comparables a los de las células T *lpr* (Fig.8A).

Sin embargo, bajo estas condiciones de falta de muerte, las células T CD4⁺ control tratadas con zVAD no manifestaban una mayor capacidad de respuesta proliferativa que las células control sin tratar, tal y como confirmaban los datos de pérdida de fluorescencia de CFSE (Fig.8B). Aunque el grado de inducción de apoptosis fue similar entre células T CD4⁺ control y *lpr* tratadas con zVAD, los datos de proliferación obtenidos permiten afirmar que, en ausencia de FAS, las células T *lpr* mantenían una clara ventaja proliferativa, a pesar se presentar las mismas características apoptóticas que las células control (Fig.8A y 8B).

Estos resultados confirman que la hiperproliferación de las células *lpr* no es una consecuencia indirecta de la resistencia a apoptosis, sino consecuencia de una mayor capacidad de división de la célula T por si misma. Los mismos resultados se obtuvieron cuando estudiamos el efecto del tratamiento con zVAD en el protocolo corto de estimulación repetida (dato no mostrado).

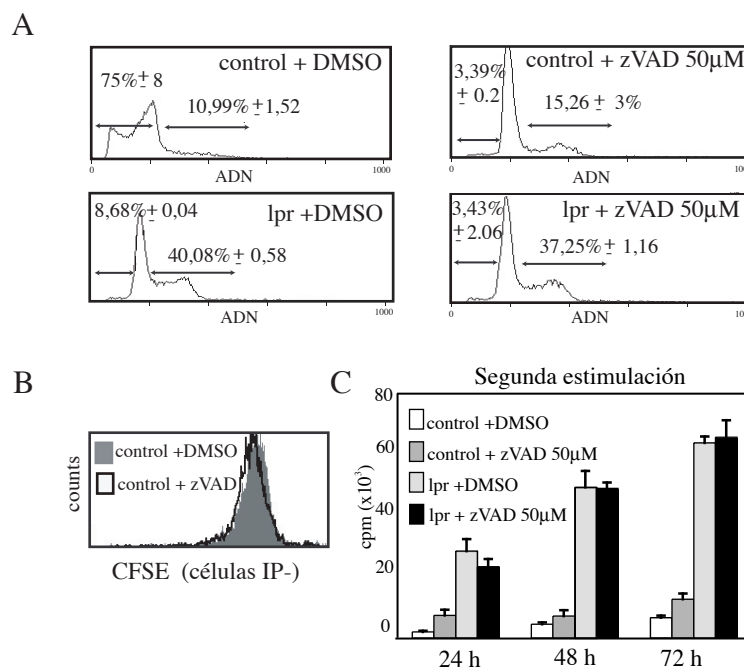


Figura 8. Respuesta proliferativa de las células T CD4⁺ durante la segunda estimulación en condiciones de inhibición de muerte . (A) Análisis del perfil de ciclo celular en células T CD4⁺ control y *lpr* tras 24 h de estimulación secundaria con Con A en presencia de zVAD (50 μM) o DMSO como control (media ± DS, n=3). (B) Pérdida de intensidad de fluorescencia de las células T CD4⁺ control marcadas con CFSE tras 72 h de estimulación secundaria con Con A en presencia de zVAD (50 μM) o DMSO. Mediante combinación con marcaje con Ioduro de Propidio, se han excluido del análisis las células muertas . (C) Cinética de incorporación de T[H³] durante la estimulación secundaria con Con A en presencia de zVAD (50 μM) o DMSO como control (media ± DS, n=3). En todos los casos se muestran los valores correspondientes a un experimento representativo de un total de 6 experimentos independientes.

En nuestro protocolo de estimulación repetida, los módulos de activación están separados por períodos de seis días de expansión con μ IL-2. Estudiamos la respuesta proliferativa de las células T en los períodos de expansión con μ IL-2 tras la primera y segunda estimulación (ver esquema Fig.4A). No encontramos diferencias significativas durante la primera expansión, sin embargo, durante el periodo de propagación con μ IL-2 tras la activación secundaria, se reveló una clara ventaja proliferativa de las células T CD4⁺ deficientes en FAS. Los datos de proliferación fueron obtenidos mediante cuantificación de incorporación de T[H³] (Fig.9A) y confirmados por marcaje con CFSE (Fig.9B). Los datos de ciclo celular no mostraban ninguna diferencia en la muerte entre ambos tipos celulares, pero sí un incremento en los porcentajes de células en división en el caso de las células T *lpr* (Fig.9C). Así pues, las características hiperproliferativas de las células *lpr* se mantenían incluso durante los períodos posteriores a la activación secundaria, indicando que las células deficientes en FAS retenían una gran capacidad de división, que les permitía extender la respuesta proliferativa más allá de la reacción inmediata a la estimulación a través del TCR. Además, los datos de ciclo celular confirmaban, una vez más, que la baja proliferación de las células T control no dependía de la inducción de apoptosis. Los mismos resultados se obtuvieron con células T CD8⁺ (dato no mostrado)

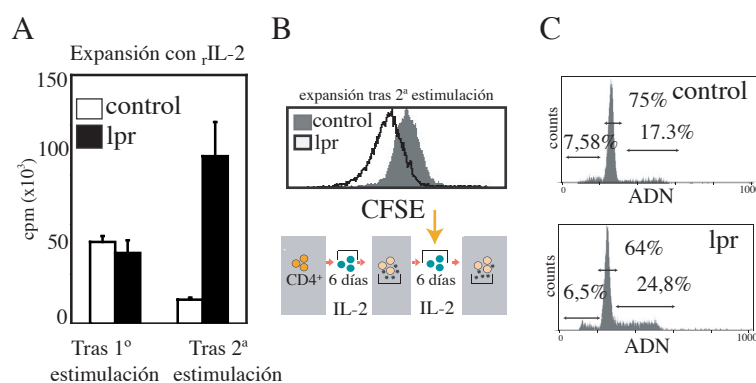


Figura 9. Características proliferativas de las células T CD4⁺ control y *lpr* durante los periodos de expansión con μ IL-2 tras la primera y segunda estimulación. (A). Incorporación de T[H³] de las células T CD4⁺ control y *lpr*

durante las 16 últimas horas de expansión con μ IL-2 tras la primera, o segunda estimulación con Con A (media \pm DS, n=3). (B) Dilución de la intensidad de fluorescencia de CFSE en células T CD4⁺ control y *lpr* al final del periodo de expansión con μ IL-2 que sigue a la segunda estimulación. (C) Valores representativos del perfil de ciclo celular obtenido tras seis días de expansión μ IL-2 tras la segunda estimulación. En todos los casos se muestran los valores correspondientes a un experimento representativo de un total de 4 experimentos independientes.

2.3 Hiperproliferación *in vivo* de las células T deficientes en FAS

Los resultados descritos establecen un nuevo papel de FAS en el control directo de la proliferación de las células T que son sometidas a una estimulación reiterada *in vitro*.

Para confirmar la relevancia fisiológica y funcional de los datos *in vitro*, hemos realizado experimentos de cuantificación de incorporación *in vivo* de 5-bromo-2'-deoxyuridina (BrdU). Esta aproximación nos permitía testar la capacidad proliferativa de las células T *lpr* en condiciones

fisiológicas. Se les suministro a los ratones BrdU disuelto en el agua de bebida durante nueve días. Este compuesto es un análogo de base que se incorporara al ADN durante el proceso de replicación. Tras este periodo de tiempo los ratones fueron sacrificados. Mediante la combinación de marcaje en superficie y tinción intracelular con anticuerpo anti-BrdU, se cuantificó el porcentaje de incorporación de BrdU por citometría de flujo en las diferentes poblaciones de células T del bazo. Con esta técnica pudimos evidenciar que *in vivo*, y en paralelo con los resultados *in vitro*, las células T CD4⁺, T CD8⁺ y células T dobles negativas (TCR $\alpha\beta$ ⁺CD4⁻CD8⁻) deficientes en FAS presentaban un claro perfil hiperproliferativo, triplicando la capacidad de proliferación con respecto al control (Fig.10).

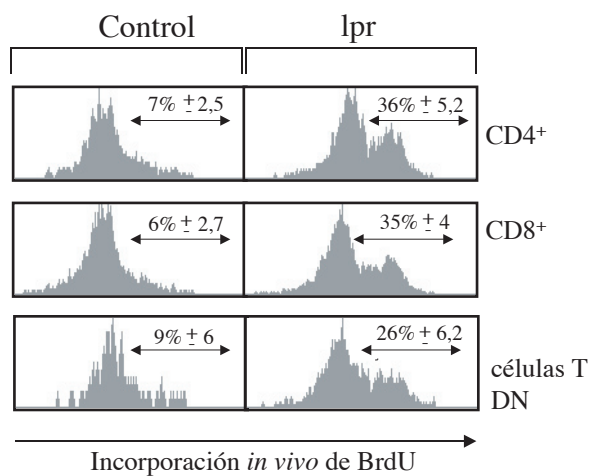


Figura 10. Análisis de las características proliferativas de las células T control y *lpr* *in vivo*. Cuantificación por citometría de flujo del porcentaje de incorporación *in vivo* de BrdU en las células T CD4⁺, T CD8⁺ y células T dobles negativas (DN) (Thy1.2⁺CD4⁻CD8⁻B220⁺) procedentes del bazo de ratones control y *lpr* de dos meses de edad (los valores se corresponden con la media ± la DS, n=3). Se muestra un experimento representativo de 3.

2.4 La inhibición de la proliferación es dependiente de FAS y requiere la interacción con FAS-L

La inducción de apoptosis dependiente de FAS está subordinada a la interacción de FAS con su ligando. Quisimos estudiar si, al igual que ocurre con la apoptosis, el control de la proliferación por FAS está vinculado a la interacción con FAS-L. Analizamos la proliferación, en respuesta a nuestro protocolo de estimulación repetida, de las células T CD4⁺ procedentes de ratones homocigóticos *gld* en fondo C57BL/6. Estos ratones se caracterizan por una alteración en la funcionalidad de FAS-L que impide su correcta interacción con FAS^{73,74,129}. La mutación *gld* tiene como consecuencia inmediata la apoptosis defectuosa en las células T y el desarrollo de una patología autoinmune que cursa con características similares al modelo *lpr*^{24,69,130,131}. Los resultados que obtuvimos fueron equivalentes a los obtenidos con el modelo deficiente en FAS. Las células *gld* no mostraban diferencias proliferativas durante la estimulación primaria. A consecuencia de la estimulación secundaria, las células deficientes en FAS-L presentaban un fenotipo hiperproliferativo (Fig.11A, panel izquierdo). Al igual que en el modelo *lpr*, las células T eran resistentes a la inducción de apoptosis (Fig.11A, panel derecho). Además, los datos de incorporación de T[H³] y CFSE revelaban que la intensidad de respuesta era equivalente entre el modelo *lpr* y *gld* (Fig.11A, panel izquierdo). Tanto las células T *gld* como *lpr* presentan un

fenotipo hiperproliferativo equivalente, indicando por tanto, que la interacción FAS/FAS-L es requerida para el control de la proliferación de las células T.

En la literatura existen trabajos que asignan a FAS-L cierta función de receptor, con capacidad de transmitir señales al interior celular cuando se expresa en la membrana de las células T¹³²⁻¹³⁶. Por tanto, en función de los datos descritos, no está claro cual de las dos moléculas, FAS o FAS-L, actúa como responsable de la transducción de esta nueva señal anti-proliferativa al interior de la célula. Para discernir este último punto hemos diseñado experimentos de cultivo mixto de células T CD4⁺ FAS deficientes (*lpr*) con células T CD4⁺ deficientes en FAS-L (*gld*). En estos experimentos, las células T se mantuvieron en cultivo por separado hasta el momento previo a la segunda estimulación. Antes de la estimulación secundaria, las células T CD4⁺ se marcaron con las sondas fluorescentes CFSE y SNARF, cuya fluorescencia era captada respectivamente por los canales FL1 y FL2 del citómetro de flujo. Al mezclar en un mismo cultivo las células marcadas con las dos sondas, la emisión diferencial de fluorescencia nos permitía diferenciar las dos poblaciones mediante citometría de flujo. Además esta técnica nos permitía cuantificar la tasa de proliferación de aquellas células que se marcaban inicialmente con CFSE (esquema en Fig.11B).

El objetivo esencial de este experimento era evaluar el efecto, en la proliferación celular, de la señalización por FAS-L (sólo presente en las células *lpr*) tras interaccionar con FAS (únicamente presente en células *gld*) y viceversa.

En un primer experimento se estudio el efecto de la señalización de FAS-L en las células T CD4⁺ *lpr*. Antes de la segunda estimulación se marcaron con CFSE las células T CD4⁺ *lpr* y con SNARF las células T CD4⁺ *gld*. Esto nos permitía valorar si la interacción de FAS presente en las células *gld* (SNAR⁺CFSE⁻) con el FAS-L presente en las células *lpr* (CFSE⁺SNARF⁻) (Fig.11C, panel superior), tenía algún efecto en la proliferación de las mismas. Comprobamos que a las 72 h de la estimulación secundaria con Con A, la dilución de la fluorescencia de CFSE de las células T *lpr* co-cultivadas con células T *gld* era similar a la detectada en un cultivo simple de células T *lpr* (Fig.11C, panel superior). Esto nos indicaba que, aunque proporcionáramos al FAS-L de la célula T *lpr* el contacto con FAS necesario (proveniente de la célula *gld*) para interaccionar y señalizar, no veíamos consecuencia alguna en la proliferación.

En el experimento complementario analizamos el efecto de la señalización por FAS sobre la proliferación de las células T CD4⁺ *gld*. Marcamos con CFSE las células T CD4⁺ *gld* y con SNARF las células T CD4⁺ *lpr*. A las 72 h de la estimulación secundaria, las células *gld* que habían estado cultivadas en presencia de células *lpr* (que expresaban FAS-L), presentaban una menor pérdida de intensidad de fluorescencia por CFSE que las cultivadas en cultivos simples (Fig.11C, panel inferior). Esto indicaba que en las células T *gld*, como consecuencia de la señalización por FAS, se producía una contención de su capacidad hiperproliferativa. La expresión de FAS y FAS-L durante la estimulación secundaria en células *gld* y *lpr*, respectivamente, fue verificada por citometría de flujo (dato no mostrado).

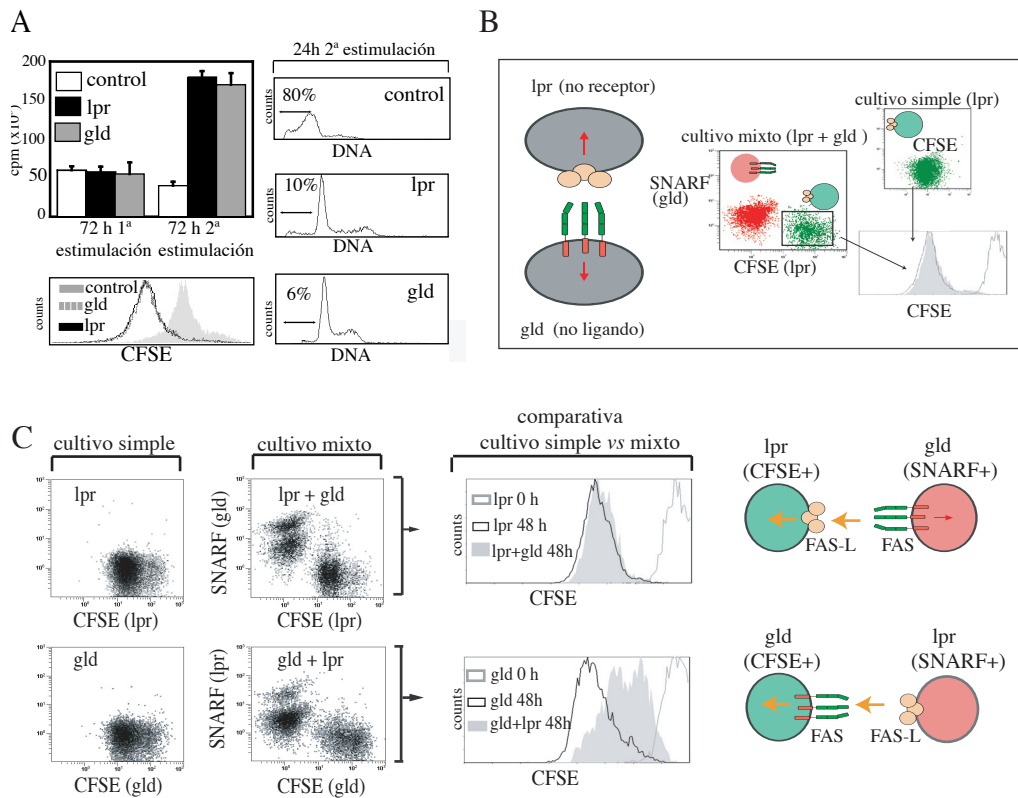


Figura 11. La inhibición de la proliferación requiere la interacción FAS/FAS-L (A) Incorporación de T[H³] de las células T CD4⁺ control, *lpr* y *gld* durante las 16 últimas horas de estimulación primaria o secundaria con Con A (panel superior izquierdo) (media \pm DS, n=3); pérdida de intensidad de fluorescencia de CFSE a las 72 h de la estimulación secundaria con Con A (panel inferior izquierdo); Perfil de ciclo celular a las 24 h de la estimulación secundaria con Con A (panel derecho). Se muestran los valores correspondientes a un experimento representativo de 3 independientes. (B) Las células T CD4⁺ *lpr* y *gld* fueron cultivadas en cultivo simples (sólo células T CD4⁺ *lpr* o sólo células T CD4⁺ *gld*) o mixtos (células T CD4⁺ *lpr* + células T CD4⁺ *gld*). En los cultivos mixtos los dos tipos celulares son diferenciados por citometría de flujo gracias al marcaje con las sondas fluorescentes CFSE y SNARF (que emiten en los canales FL1 y FL2 respectivamente). La pérdida de intensidad de fluorescencia de CFSE fue evaluada para ambos tipos de células, tanto en los cultivos simples como mixtos. (C) Intensidad de fluorescencia de las células T CD4⁺ *lpr* marcadas con CFSE en cultivos simples y mixtos tras 48 h de estimulación secundaria (paneles superiores, parte izquierda). Comparativa de la intensidad de fluorescencia en las células *lpr* cultivadas solas o en presencia de células T CD4⁺ *gld* marcadas con SNARF (panel superior, parte derecha); experimento complementario en el que se evalúa la pérdida de fluorescencia en células T CD4⁺ *gld* cultivadas solas o en presencia de células T CD4⁺ *lpr* marcadas con SNARF (paneles inferiores) a las 48 h de la estimulación secundaria. Se muestra un experimento representativo de 3 realizados de forma independiente.

Estos datos demostraban que, para el control de la proliferación, era necesaria la interacción de FAS y FAS-L y que, tras la unión de ambos, FAS inhibía de forma directa la proliferación de las células T.

Para confirmar estos resultados tratamos las células T CD4⁺ *gld* con FAS-L recombinante (FAS-L) en una estimulación secundaria. Comprobamos que, de forma dosis-dependiente, FAS-L podía inhibir la proliferación de células *gld* T CD4⁺ (Fig.12A). Como control, la adición de

FAS-L a las células T *lpr* no tuvo consecuencia alguna. Ya que la adición de FAS-L al cultivo de células *gld* provocaba la inducción de apoptosis (Fig.12B, panel derecho), combinamos el tratamiento con zVAD (50μM). Comprobamos que, independientemente de su papel en inducción de muerte celular, el tratamiento con FAS-L inhibía la proliferación de las células T CD4⁺ *gld* (Fig.12B, panel izquierdo).

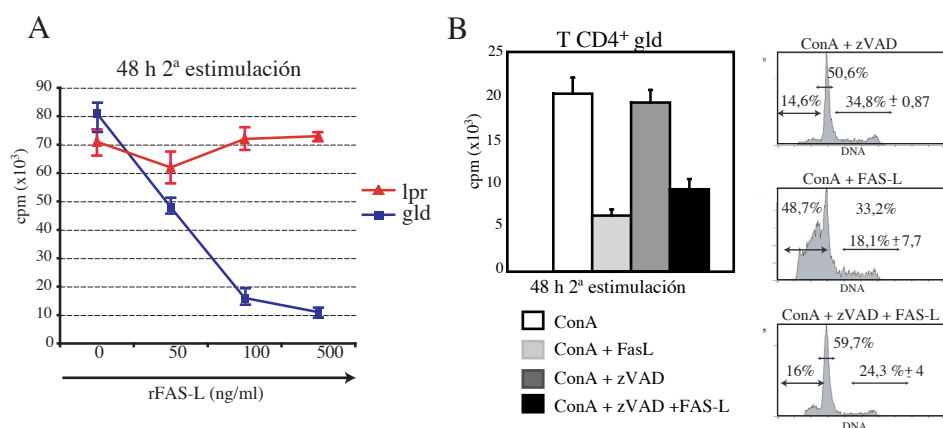


Figura 12. rFAS-L inhibe la proliferación de las células T CD4⁺ *gld* durante la estimulación secundaria con Con
A. (A) Incorporación de T[H³] por las células T CD4⁺ *gld* y *lpr* a las 48 h de la segunda estimulación con Con A en presencia de las concentraciones indicadas de FAS-L recombinante (media ± DS, n=3). (B) Incorporación de T[H³] por las células T CD4⁺ *gld* a las 48 h de la segunda estimulación con Con A en presencia de zVAD (50 μM) y/o rFAS-L (500ng/ml) (panel izquierdo) (media ± DS, n=3); perfil de ciclo celular obtenido a las 48 h (panel derecho) de la segunda estimulación con cada uno de los tratamientos.

2.5 Implicación del Dominio de Muerte en la inhibición de la proliferación: un modelo animal para el estudio del Síndrome Autoinmune Linfoproliferativo Tipo Ia

En su cola citoplasmática, FAS presenta un dominio de 80 aminoácidos conocido como Dominio de Muerte (en inglés abreviado DD, *Death Domain*). Tras la interacción FAS/FAS-L se produce un cambio conformacional y de orientación, que posibilita el reclutamiento de FADD al DD para iniciar la cascada apoptótica. Quisimos estudiar si el DD de FAS era requerido para la inhibición de la proliferación. Para ello estudiamos el perfil proliferativo de las células T CD4⁺ procedentes de ratones *lpr*^{cg} en fondo CBA. Las células T de estos ratones se caracterizan por tener una expresión normal en membrana de FAS y FAS-L, pero una ausencia total de señalización apoptótica, debido a una mutación en el DD que impide el reclutamiento de FADD^{71,137}. Fenotípicamente, estos ratones desarrollan una patología autoinmune equivalente al modelo *lpr* y *gld*.

No detectamos diferencias significativas de proliferación en una estimulación primaria (dato no mostrado). Sin embargo, al igual que el caso de las células *lpr* y *gld*, las células T CD4⁺ procedentes de ratones *lpr*^{cg} presentaban una ventaja proliferativa, respecto a las células T control,

a partir de la segunda estimulación con Con A (Fig.13). Así pues, este dato apuntaba que tras la interacción de FAS con FAS-L, el DD de FAS era necesario para el traslado efectivo de la señal de control de proliferación al interior de la célula T.

En el hombre, defectos genéticos que afectan a la funcionalidad de FAS o FAS-L se asocian con un síndrome autoinmune conocido como Síndrome Autoinmune Linfoproliferativo (en inglés abreviado, ALPS). El ALPS se caracteriza por un cuadro clínico de características muy similares a los modelos *lpr*, *gld* y *lpr^{cg}* (Ver introducción). Al igual que ocurre con los modelos animales, se ha atribuido la patología autoinmune a una apoptosis defectuosa y consecuente acumulación pasiva de linfocitos (revisado en^{27,29,138}). Sin embargo, los análisis anatómo-patológicos e histológicos de los ganglios de estos pacientes muestran rasgos hiperproliferativos que no han podido ser confirmados ni caracterizados *in vitro*.

La gran mayoría de pacientes de ALPS pertenecen al subtipo Ia. Estos individuos presentan mutaciones en heterocigosis que afectan a la funcionalidad de FAS. Más del 60% de estas mutaciones se localizan en el DD.

Para generar el equivalente molecular en ratón de un paciente de ALPS tipo Ia, con mutaciones en el DD, cruzamos los ratones homocigóticos *lpr^{cg}* con ratones control CBA y generamos así ratones *lpr^{cg}* heterocigóticos. El análisis de las características proliferativas de las células T CD4⁺ de estos ratones, reveló que la mutación en heterocigosis en el DD era dominante para el fenotipo hiperproliferativo, ya que las células T CD4⁺ heterocigóticas para la mutación *lpr^{cg}*, proliferaban a la misma tasa que las células *lpr^{cg}* homocigóticas en una estimulación secundaria con Con A (Fig. 13).

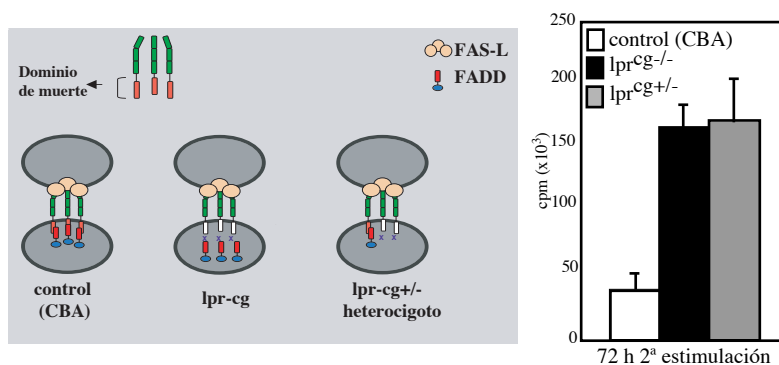


Figura 13. Estudio de la proliferación de las células T CD4⁺ procedentes del bazo de ratones *lpr^{cg}* durante la estimulación secundaria con Con A. Incorporación de T[H³] por las células T CD4⁺ control (CBA), *lpr^{cg}* (*lpr^{cg}*-homocigoto) y *lpr^{cg}+/-* (*lpr^{cg}*-heterocigoto) en las últimas 16 h de la estimulación secundaria con Con A (media \pm DS, n=3). Se muestra un experimento representativo de 3 realizados de forma independiente.

2.6 Hiperproliferación de las células T procedentes de pacientes del Síndrome Autoinmune Linfoproliferativo Tipo Ia

Quisimos estudiar si los datos de hiperproliferación obtenidos con los modelos murinos *lpr*, *gld* y *lpr^{cg}* eran extensibles al síndrome humano. Analizamos el perfil proliferativo *in vitro* de células T purificadas por MACS de dos familias no relacionadas de pacientes de ALPS Tipo Ia. Los pacientes de ambas familias presentaban hipergammaglobulinemia, adenopatía y acumulación de células TCR $\alpha\beta$ ⁺CD4⁺CD8⁻. El único paciente de la Familia A (P-FA) portaba una mutación en FAS G493T (Arg234Leu); los dos pacientes de la familia B (P-1-FB, P-2-FB) presentan mutaciones G493T (Arg234Leu) en el gen de FAS. En ambas familias las mutaciones resultaron heterocigóticas y estaban localizadas en el exon 9 del gen de FAS (TNFRSF6), que afecta al DD de la proteína. La disfunción de FAS debido a las mutaciones descritas, fue confirmada, en ensayos de inducción de apoptosis, mediante el tratamiento de las células T con un anticuerpo monoclonal anti-FAS al final del primer periodo de expansión con γ IL-2 (Fig.14).

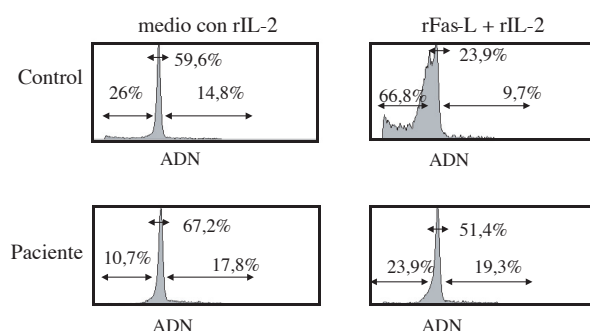


Figura 14. La señal apoptótica derivada de FAS es defectuosa en pacientes de ALPS tipo Ia con mutaciones en heterocigosis en el Dominio De Muerte. Las células T procedentes de controles sanos y pacientes de ALPS tipo Ia, obtenidas de sangre periférica mediante aislamiento por selección negativa con MACS, fueron estimuladas con Con A. A continuación, las células se expandieron durante 6 días

con γ IL-2. Al final de la expansión, se renovó el medio solo o suplementado con rFAS-L (500ng/ml) y se cuantificó la inducción de apoptosis tras 24 h de cultivo. Los datos mostrados son representativos de los obtenidos con las células T del paciente de la Familia A.

Purificamos células T totales (o células T CD4⁺ o T CD8⁺ por separado) de sangre periférica y las sometimos a un protocolo de estimulación repetida, análogo al utilizado con las células murinas, con la salvedad de que el período de expansión con γ IL-2 tras la estimulación primaria dura nueve días en lugar de seis. No detectamos diferencias en una primera estimulación, sin embargo, tras la expansión con γ IL-2, cuando las células T eran estimuladas por segunda vez, presentaban una clara ventaja proliferativa frente a las células T procedentes de controles sanos. Este dato fue confirmado mediante cuantificación de incorporación de T[H³] (Fig.15A) y análisis por citometría de flujo de pérdida de fluorescencia de CFSE a las 72 h de la estimulación secundaria con Con A (Fig.15B). Los mismos resultados se obtuvieron cuando se utilizaba

como activador Fitohemaglutinina (en inglés abreviado, PHA) (Fig.15C) o anti-CD3 (dato no mostrado), confirmando que en células humanas, FAS controla la proliferación de las células T activadas repetidamente.

Cuando analizamos la cinética de muerte, obtenida por ciclo celular durante la segunda estimulación (Fig.15D), observamos que la dinámica de inducción de apoptosis estaba retrasada con respecto a la observada en las células T de ratón. No detectamos muerte en las células T control hasta las 72h después de la estimulación secundaria (en las células T de ratón la apoptosis tenía lugar antes de las 24 h). Sin embargo, a partir de las 24h, ya detectamos un incremento en el porcentaje de células T proliferando en el caso de los pacientes de ALPS (Fig. 15D). Esta diferencia iba en aumento hasta un pico máximo a las 72 h, en paralelo con la cinética de incorporación de T[H³] (Fig.15C). Así pues, la ventaja proliferativa precedía al fenómeno apoptótico.

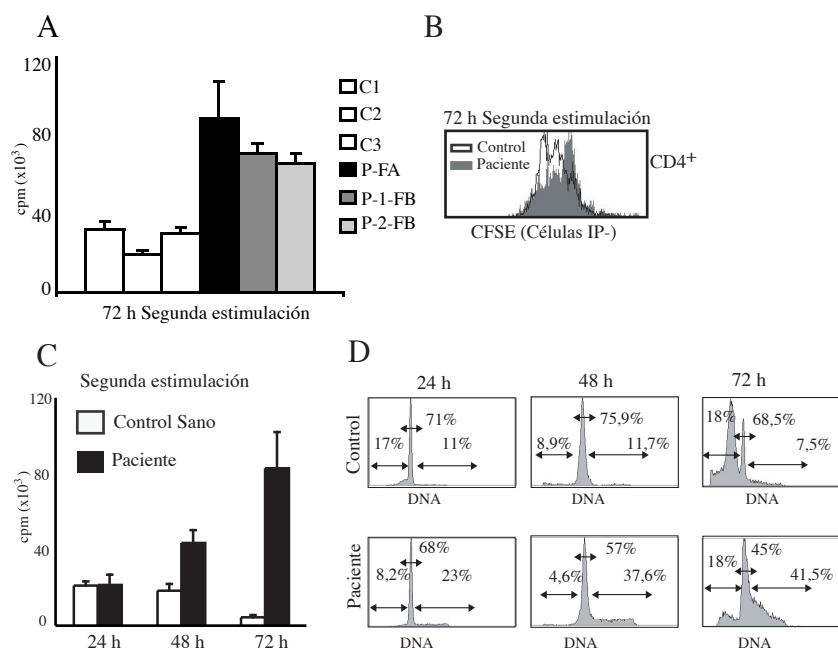


Figura 15. Análisis de las características proliferativas, en respuesta a la estimulación secundaria *in vitro*, de las células T de pacientes de ALPS .(A) Incorporación de T[H³] por las células T procedentes de controles sanos (C) y pacientes de ALPS tipo Ia (P) en las últimas 16 h de la estimulación secundaria con Con A (3μg/ml). Las células T se obtuvieron de sangre periférica mediante aislamiento por selección negativa con MACS. Los pacientes pertenecen a dos familias no relacionadas (un paciente de la Familia A: P-FA y dos pacientes de la familia B: P-1-FB, P-2-FB). Los valores se corresponden con la media ± DS obtenidos en 2 experimentos independientes con cada uno de los pacientes y controles. **(B)** Pérdida de intensidad de fluorescencia de CFSE en las células T CD4⁺ procedentes de un control sano y el paciente P-FA, tras 72 h de estimulación secundaria con Con A (se muestra un experimento representativo de 2). Las células se obtuvieron mediante aislamiento por selección negativa con MACS a partir de sangre periférica. Las células muertas han sido excluidas del análisis, se muestran las células IP⁻ **(C)** Cinética de incorporación de T[H³] durante la estimulación secundaria con Fitohemaglutinina (PHA, 2μg/ml) en células T procedentes de controles sanos (C) y el paciente P-FA. **(D)** Cinética de ciclo celular durante la estimulación secundaria con Fitohemaglutinina (PHA) en células T procedentes de controles sanos (C) y paciente P-FA. (en C y D se muestra un experimento representativo de 2, datos similares se obtuvieron con los pacientes P-1-FB, P-2-FB).

Esta disociación en el tiempo y los datos de CFSE nos permitía, una vez más, confirmar que el fenotipo hiperproliferativo asociado a la deficiencia funcional de FAS, es consecuencia de un mayor potencial intrínseco de replicación de las células T deficientes en FAS y no consecuencia indirecta de la falta de apoptosis.

2.7 Altos niveles de actividad Telomerasa en las células T *lpr*

A consecuencia de las características moleculares de la replicación del ADN genómico, en el proceso de replicación que tiene lugar en el contexto de la división celular, la ADN polimerasa común no puede replicar al completo los telómeros (extremos lineales de los cromosomas). Como consecuencia, en ausencia de mecanismos compensatorios, tiene lugar un progresivo acortamiento telomérico a medida que la célula acumula rondas de replicación. El acortamiento telomérico provoca una pérdida de funcionalidad de los cromosomas individuales, que asociado a una alteración en la estructura de la cromatina, activa los mecanismos celulares de control de daño al ADN, que desencadenan la parada de la división celular (senescencia replicativa) y/o apoptosis (revisado en^{139,140}). En células eucariotas una ribonucleoproteína con acción transcriptasa inversa, la Telomerasa, permite mantener la estabilidad telomérica extendiendo los extremos 3' mediante la síntesis de repeticiones de secuencias teloméricas simples (revisado en^{139,140}). En células con alta tasa replicativa, el acortamiento telomérico puede prevenirse si la célula dispone de un nivel suficientemente alto de Telomerasa. Además, se ha comprobado que la sobre-expresión de la Telomerasa en modelos murinos y líneas celulares promueve y acelera, por sí misma, la división celular y la supervivencia, independientemente de su papel en la estabilidad telomérica. Por tanto, una alta expresión de Telomerasa permite un crecimiento constante e indefinido. De hecho, un 90% de tumores reactivan la Telomerasa en algún momento de su desarrollo, lo que contribuye a su inmortalidad (revisado en^{139,141,142}).

Hemos descrito que las células T *lpr* presentan un doble fenotipo proliferativo, por un lado tienen una alta tasa de división a partir de la segunda estimulación, comparado con las células control y por otro lado, soportan un elevado número de rondas de estimulación (al menos ocho), sin perder su alta capacidad replicativa. Esta facultad de las células deficientes en FAS de mantener una alta tasa de crecimiento de forma sostenida, en contraposición a las células control, nos llevó a estudiar si las características teloméricas y/o los niveles de actividad Telomerasa en los distintos estadios de estimulación, eran responsables de las diferencias observadas.

Analizamos los niveles de actividad Telomerasa a las 72 h de la segunda estimulación en las células T CD4⁺ control y deficientes en FAS. Comprobamos que los niveles de la actividad enzimática Telomerasa eran sustancialmente mayores en el caso de las células deficientes en FAS (Fig.16A). Los mismos resultados se obtuvieron tras la tercera estimulación (dato no mostrado). Sin embargo, no encontramos diferencias en la longitud telomérica entre las células T *lpr* y las células T control, al medir la longitud de los telómeros tras la primera, segunda o tercera ronda de estimulación con Con A. Los datos mostrados se corresponden con los obtenidos tras la segunda estimulación (Fig.16B).

Estos resultados nos indicaban que la menor capacidad replicativa en las células T control, no era dependiente de un excesivo acortamiento telomérico y que, los niveles de actividad telomerasa aunque menores que en las células T *lpr*, eran suficientes para garantizar la estabilidad telomérica y por tanto la capacidad de replicación.

Por otro lado, es posible sugerir que el incremento en la actividad Telomerasa observado en ausencia de FAS (Fig.16A), permite a la célula T *lpr* soportar un elevado número de rondas de activación sin peligro de alteración en el equilibrio telomérico y por tanto, sin entrar en senescencia replicativa.

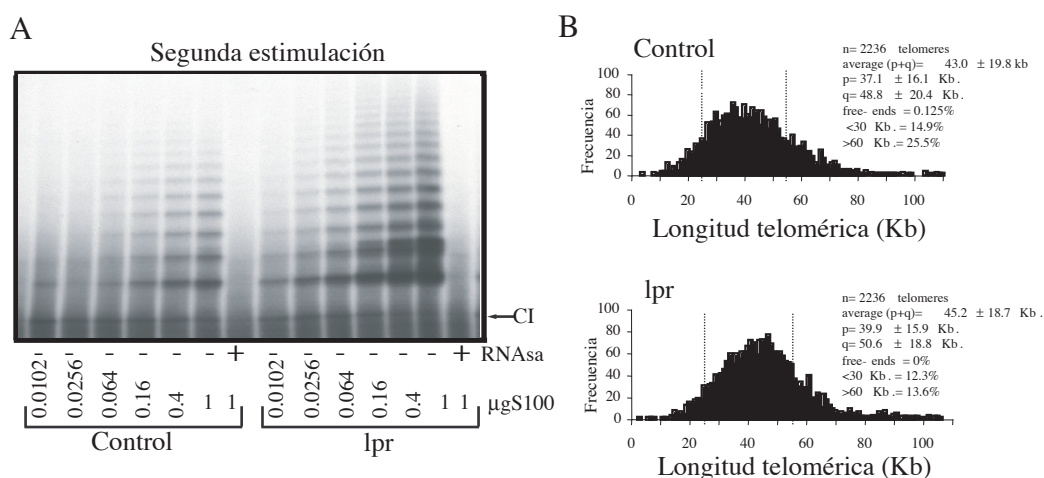


Figura 16. Niveles de actividad telomerasa y longitud telomérica media en las células T CD4⁺ control y *lpr* tras la segunda estimulación con Con A. (A) Actividad telomerasa en células T CD4⁺ control y *lpr* a las 72 h de la estimulación secundaria con Con A. Se indica la concentración de los extractos [(-) sin tratar, (+) tratados con RNAsa] CI, control interno. (experimento representativo de 3 independientes). (B) Longitud telomérica a las 72 h de la estimulación secundaria con Con A. Los histogramas muestran las frecuencia de longitud telomérica determinada por Q-FISH. (experimento representativo de 3 independientes).

3. Consecuencias de la señalización mediada por FAS en la activación TCR-dependiente de la célula T

Hemos comprobado que FAS ejerce un papel fundamental en el control específico de la proliferación de las células T activadas. La proliferación linfocitaria es, en gran medida, dependiente de la activación antígeno-específica del TCR y consecuencia directa de los acontecimientos moleculares ligados a ella. Nuestro siguiente objetivo consistía en definir el mecanismo molecular responsable de la hiperproliferación de las células T deficientes en FAS tras una estimulación repetida.

3.1 La actividad caspasa es requerida para la proliferación secundaria. Papel de FAS como regulador negativo de la proliferación dependiente de caspasas.

Se ha comprobado que, además de su papel en apoptosis, la actividad caspasa es necesaria en el proceso de activación y proliferación de las células T tras la estimulación del TCR^{55,84}. La inhibición *in vitro* de la actividad caspasa, en células T CD4⁺ humanas y de ratón, provoca una inhibición de la proliferación y regulación de la expresión de CD25 (cadena α del receptor de alta afinidad de la IL-2) tras la activación primaria^{86,88,143}. Además, en humanos y ratones, defectos en la expresión de C-8 *in vivo* conducen a defectos en la activación y proliferación de las células T e inmunodeficiencia^{88,89}.

Estudiamos en que medida la hiperactivación e hiperproliferación de las células T CD4⁺ deficientes en FAS estaba subordinada a la activación de caspasas. Simultáneamente a la estimulación secundaria con Con A, tratamos las células T *lpr* con el inhibidor general de caspasas zVAD. Como hemos mencionado anteriormente, este péptido tiene la capacidad de unirse de forma específica al centro activo de diferentes caspasas, impidiendo su actividad enzimática. Mediante cuantificación de incorporación de T[H³] y pérdida de fluorescencia de CFSE comprobamos que el tratamiento con bajas dosis de zVAD (50 μ M) no tenía ningún efecto significativo en la proliferación de las células *lpr* (Fig.17A y B y Fig.8). Sin embargo, las células T CD4⁺ *lpr* tratadas con dosis superiores a 100 μ M de zVAD, presentaban una significativa disminución en su capacidad proliferativa a partir de las 48h de estimulación secundaria con Con A (Fig.17 A y B). El análisis por ciclo celular de las células tratadas con zVAD no revelaba diferencias en la muerte, descartando, por tanto, un posible efecto toxico del tratamiento (Fig.17C).

El tratamiento de las células control T CD4⁺ procedentes de ratones C57BL/6 con dosis elevadas de zVAD tenía también un efecto inhibitorio sobre la proliferación. Sin embargo, los datos revelaban que el efecto era proporcionalmente mucho mayor en el caso de las células *lpr* que en de las células control (Fig.17D).

Obtuvimos resultados similares cuando, en una estimulación secundaria, tratamos las células T CD4⁺ *lpr* con el inhibidor específico de la actividad de la C-8 Z-IETD (Z-I-E(OMe)-T-D-(Ome)-FMK). Comprobamos que como consecuencia del tratamiento, las células T *lpr* presentaban una menor proliferación en comparación con las células *lpr* T tratadas con DMSO (Fig.17E). Los efectos toxicos del inhibidor fueron descartados mediante análisis de muerte por ciclo celular tras el tratamiento (dato no mostrado). La inducción de actividad Caspasa-8 fue confirmada en las células T *lpr* mediante ensayos colorimétricos realizados a las 24 h de la segunda estimulación (dato no mostrado)

La dependencia de la proliferación de las células T deficientes en FAS con respecto a la actividad caspasa, fue confirmada cuando utilizamos la misma aproximación experimental con las células T procedentes de pacientes de ALPS. Hemos descrito anteriormente que, como consecuencia de la activación secundaria, las células T de los pacientes de ALPS Tipo Ia exhiben una mayor capacidad de proliferación (Fig.15). Al igual que en el caso de las células T procedentes de ratones *lpr*, el tratamiento con zVAD permite una moderación de la hiperproliferación de las células T de estos pacientes tras la activación secundaria (Fig.17F).

Los datos confirmaban que para la hiperproliferación de las células T deficientes en FAS y en general para la proliferación secundaria, se requiere la activación de caspasas. Ya que las células *lpr* presentan un defecto en la expresión de FAS, es obvio que la activación de las caspasas necesaria para la proliferación es independiente de la señalización mediada por FAS.

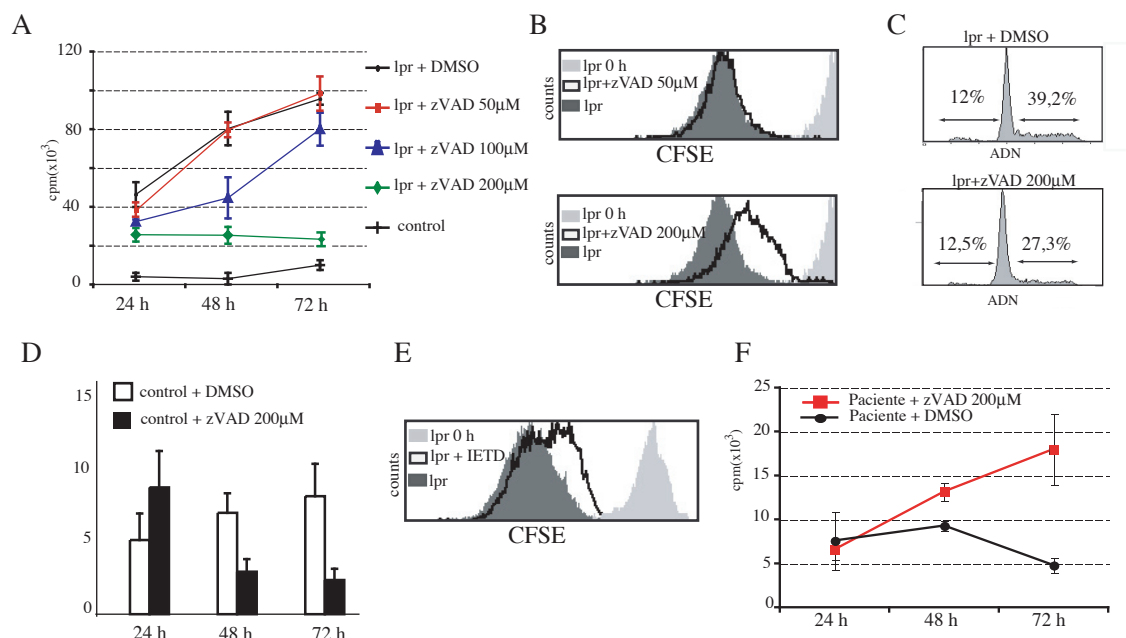


Figura 17. Efecto de la inhibición de la actividad caspasa sobre la proliferación de las células T durante la estimulación secundaria. (A) Cinética de incorporación de T[H³] por células T CD4⁺ durante la estimulación secundaria con Con A combinada con el tratamiento con las concentraciones indicadas de zVAD o DMSO, (media ± DS, n=3). Se muestra un experimento representativo de 4 independientes. (B) Pérdida de la intensidad de fluorescencia de CFSE en células T CD4⁺ *lpr* tras 72 h de estimulación secundaria con Con A y DMSO, o con Con A y zVAD a las concentraciones indicadas. Los datos son representativos de 3 experimentos independientes con resultados similares. (C) Análisis del perfil de ciclo celular en células T CD4⁺ *lpr* tras 24 h de estimulación secundaria con Con A en presencia de zVAD (200 μM) o DMSO como control. Se muestra un experimento representativo. (D) Cinética de incorporación de T[H³] por células T CD4⁺ control durante la estimulación secundaria con Con A y DMSO, o Con A combinada con el tratamiento con zVAD (200μM), (media ± DS, n=3). Se muestra un experimento representativo de 3 independientes. (E) Pérdida de la intensidad de fluorescencia de CFSE en células T CD4⁺ *lpr* tras 72 h de estimulación secundaria con Con A o con Con A + Z-IETD (200μM), inhibidor específico de la Caspasa-8. Histograma representativo de 2 experimentos independientes. (F) Cinética de incorporación de T[H³] por células T procedentes de pacientes de ALPS tipo Ia durante la estimulación secundaria con Con A y DMSO, o Con A combinada con el tratamiento con zVAD (200μM).

3.2 FAS regula negativamente la activación de NF-κB en células T activadas resistentes a apoptosis.

Recientemente se ha descrito que, en células T, la C-8 es un elemento esencial en la activación del factor de transcripción nuclear κB (en inglés abreviado, NF-κB) dependiente de la estimulación del TCR⁹¹⁻⁹⁴. Estudiamos si tras una estimulación repetida, la deficiencia en FAS afectaba a la ruta de activación de NF-κB en las células T CD4⁺. Los elementos de unión al ADN

de NF- κ B (p50/p65) están retenidos y mantenidos inactivos en el citoplasma, unidos al inhibidor α de NF- κ B (en inglés abreviado, I κ B α). Tras la estimulación de la célula T se produce una rápida fosforilación y consecuente degradación de I κ B α , lo que permite la liberación y traslocación al núcleo de NF- κ B (revisado en ^{95,104,144}). Como consecuencia de la estimulación repetida hemos detectado, por *Western Blot*, una mayor fosforilación de I κ B α en las células T CD4⁺ deficientes en FAS, en comparación con las células T control (Fig.18A). La mayor fosforilación de I κ B α en las células T *lpr* se acompañaba de una rápida degradación de la proteína tras la activación secundaria (Fig.18A). El análisis mediante EMSA de la actividad transcripcional de NF- κ B en extractos nucleares obtenidos en la segunda estimulación, a partir de células T CD4⁺ control o *lpr*, mostraban una mayor capacidad de unión de NF- κ B a una secuencia consenso de ADN en el caso de los extractos procedentes de las células T *lpr* (Fig.18B).

En correlación con la menor proliferación, los extractos nucleares procedentes de células T CD4⁺ *lpr* tratadas con zVAD presentaban una menor actividad de unión de NF- κ B al DNA, comparada con las células T *lpr* tratadas sólo con DMSO (Fig.18B). Por *Western Blot*, comprobamos que los extractos citoplasmáticos de las células T *lpr* tratadas con zVAD presentaban mayores niveles de expresión de I κ B α (Fig.18C), indicando que la degradación de I κ B α y la activación de NF- κ B es dependiente de la activación de caspasas en las células T *lpr*.

En todos los casos, los extractos proteicos fueron obtenidos a partir de una población de células vivas tras eliminar las células muertas mediante centrifugación en un gradiente de Ficoll.

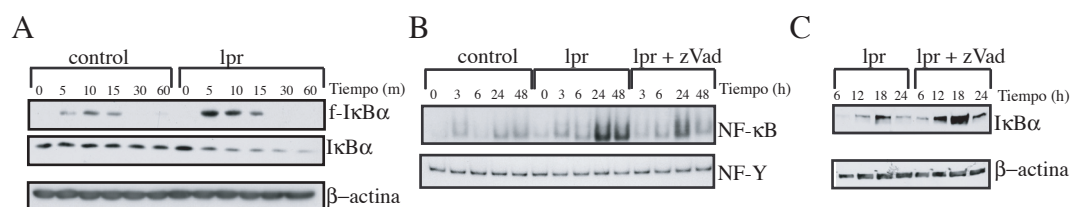


Figura 18. FAS regula negativamente la activación de NF- κ B durante la estimulación secundaria. (A) Análisis por *Western Blot* de la cinética de fosforilación y degradación de I κ B α en lisados de células T CD4⁺ control y *lpr* obtenidos a los tiempos indicados de la segunda estimulación con Con A. (B) Valoración por EMSA de la capacidad de unión de una sonda específica para NF- κ B, marcada radiactivamente con P³², en extractos nucleares de células T CD4⁺ control y *lpr* estimuladas secundariamente con Con A y células T CD4⁺ *lpr* estimuladas con Con A + zVAD (200 μ M) (para la obtención de los extractos se utilizaron células vivas purificadas por gradiente de centrifugación en Ficoll a los tiempos indicados). Se utilizó una sonda para NF-Y como control de carga calidad de los extractos nucleares. (C) Análisis por *Western Blot* de la expresión de expresión de I κ B α en lisados celulares procedentes de células T CD4⁺ *lpr* estimuladas con Con A, o con Con A + zVAD (200 μ M).

La actividad transcripcional de NF- κ B es requerida para la transcripción de CD25 y la activación TCR-dependiente de vías de supervivencia y proliferación en las células T^{145 95,144}. En paralelo con el fenotipo hiperproliferativo, tras la segunda estimulación hemos observado, por citometría de flujo, una mayor expresión de CD25 en las células T CD4⁺ procedentes de los ratones *lpr* o de los pacientes de ALPS, en comparación con las células T control (Fig.19A y B) (todos los marcajes *in vitro* para CD25 resultaron negativos para Foxp3). Acorde con la inhibición de la actividad transcripcional de NF- κ B, el nivel de expresión en membrana de CD25 en las células T *lpr* tratadas con zVAD se veía disminuido con respecto a las células T *lpr* sin tratar (Fig.19C). Al igual que en el caso de las células procedentes de ratones *lpr*, el tratamiento con zVAD conlleva una inhibición de la expresión de CD25 en las células T de los pacientes de ALPS (Fig.19D).

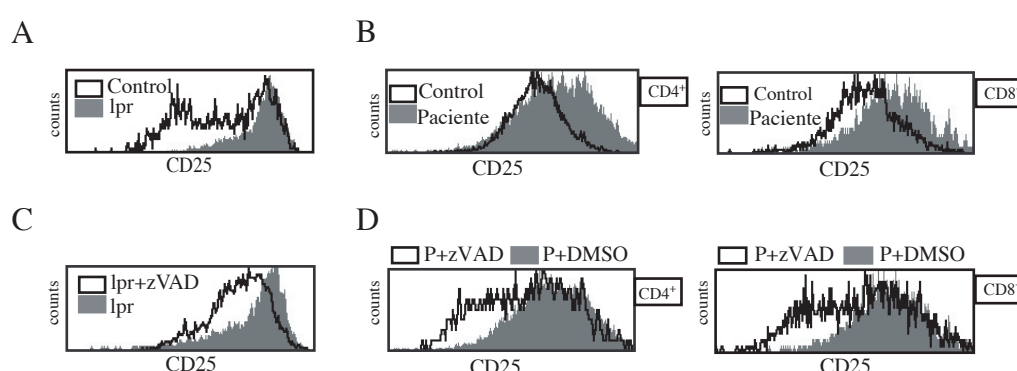


Figura 19. Expresión de CD25 en células T control, *lpr* y células T de pacientes de ALPS tipo Ia durante la estimulación secundaria. (A) Expresión por citometría de flujo de CD25, a las 72 h de la estimulación secundaria con Con A, en células T CD4⁺ control y *lpr*. (B) Niveles de expresión de CD25, a las 72 h de la segunda estimulación con PHA, en células T CD4⁺ y T CD8⁺ procedentes de controles sanos y pacientes de ALPS tipo Ia. (C) Expresión de CD25, a las 72 h de la segunda estimulación con Con A, en células T CD4⁺ *lpr* y células T CD4⁺ *lpr* estimuladas en presencia de zVAD (200 μ M). (D) Expresión de CD25 a las 72 h de la segunda estimulación con PHA en células T CD4⁺ y T CD8⁺, procedentes de pacientes de ALPS tipo Ia, tratadas y sin tratar con zVAD (200 μ M). En todos los casos se muestran la expresión de CD25 en células vivas (IP-).

En base a estos resultados podemos argumentar que la ventaja proliferativa de las células T deficientes en FAS es dependiente de la activación de caspasas y está vinculada a una hiperactivación de la ruta de activación de NF- κ B.

Aunque el papel de las caspasas en activación de células T se ha demostrado funcionalmente, la mecanística molecular que liga la actividad caspasa a los eventos bioquímicos responsables de la activación celular tras la estimulación del TCR, no está todavía definida con concreción. Sabemos que, al menos, la C-8 es fundamental para la correcta activación TCR-dependiente de NF- κ B⁹¹⁻⁹⁴. Tras la activación del TCR, la C-8 es reclutada al complejo de activación CBM (formado por CARMA-1, BCL-10, y MALT-1) y en este contexto molecular permite la degradación de I κ B α y la consecuente traslocación al núcleo de NF- κ B. En el proceso de activación de NF- κ B dependiente de C-8, se ha descrito que es fundamental la actividad

enzimática de la caspasa, pero no su autoproteolisis (que si es requerido para la inducción de apoptosis) (revisado en^{25,55}). Los trabajos realizados describen que, tras la estimulación del TCR, la forma enzimáticamente activa de la C-8 se corresponde con la forma no truncada de 52kDa (en inglés, *full lenght C-8*). Por *Western Blot* comprobamos que, durante la estimulación secundaria, la forma detectable de C-8 en las células deficientes en FAS se correspondía con la forma no procesada de 52Kda de la C-8, no detectándose evidencias de autoproteolisis en ausencia de FAS. (Fig.20A) (el anticuerpo utilizado reconoce la forma no truncada de la C-8 p52 así como la subunidad p10 resultante de la autoproteolisis).

Se ha comprobado que la forma no truncada de c-FLIP_L (p55c-FLIP_L) puede comportarse como un sustrato específico de la C-8. Se ha descrito que p55-cFLIP_L puede heterodimerizar con la forma no procesada de la C-8 provocando su activación, aunque no su autoproteolisis¹⁴⁶⁻¹⁴⁸. Como consecuencia, la C-8 activa induce la escisión de c-FLIP_L, dando lugar a un fragmento N-terminal (p43-cFLIP)^{63,93,146,149}. Este fragmento p43cFLIP puede interactuar a su vez con proteínas adaptadoras que promueven la activación de NF- κ B^{93,149,150}. En consistencia con lo descrito anteriormente y en paralelo a los datos de hiper-activación de NF- κ B, las células T CD4⁺ deficientes en FAS presentan altos niveles de c-FLIP_L y su forma procesada complementaria 43cFLIP tras la activación secundaria con Con A, en comparación con T células control (Fig.20B)

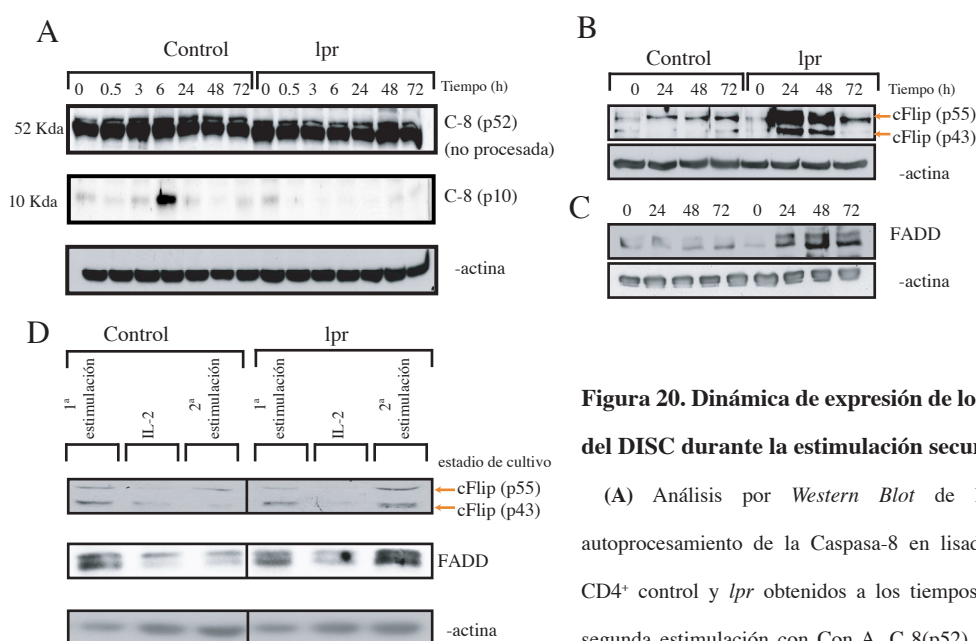


Figura 20. Dinámica de expresión de los componentes del DISC durante la estimulación secundaria.

(A) Análisis por *Western Blot* de la expresión y autoproteolisis de la Caspasa-8 en lisados de células T CD4⁺ control y *lpr* obtenidos a los tiempos indicados de la segunda estimulación con Con A. C-8(p52), forma nativa no autoproteolizada; C-8(p10), forma autoproteolizada. (B) Cinética de expresión y procesamiento de la c-FLIP_L en lisados de células T CD4⁺ control y *lpr* obtenidos a los tiempos indicados de la segunda estimulación con Con A. (C) Cinética de expresión de FADD por *Western Blot* en células T control y *lpr* durante la segunda estimulación con Con A. (D) Expresión de c-FLIP_L y FADD al término de la primera estimulación con Con A, al final del periodo de expansión con IL-2 que sigue a la primera estimulación y a las 72 h de la estimulación secundaria. Todos los lisados celulares proceden de células vivas, purificadas por centrifugación en un gradiente de Ficoll.

La proteína adaptadora FADD es transientemente reclutada al complejo CBM⁹¹. En células T, deficiencias genéticas de FADD o expresión de dominantes negativos de FADD se asocian con defectos en la activación y proliferación tras activación del TCR^{78,79,83,151}. Tras una estimulación secundaria con Con A las células T *lpr* presentaban altos niveles de FADD en comparación con las células T control (Fig.20C). Durante la estimulación primaria no se detectaron diferencias en la expresión de FADD o FLIP entre células T CD4⁺ control y células procedentes de ratones *lpr* (Fig.20D).

En conjunto, estos datos avalan la hipótesis de que, en células T control activadas que sobreviven a apoptosis, FAS controla la activación y proliferación celular, regulando negativamente la activación de NF-κB dependiente de la actividad C-8.

3.3 FAS regula negativamente la activación de ERK-1/2 en células T activadas resistentes a apoptosis

Las MAP-quinasas (del inglés abreviado, *mitogen activated protein*), forman una gran familia de proteínas con actividad quinasa en residuos seronina/treonina, implicadas en respuestas celulares frente a señales de receptores de membrana (revisado en^{152,153}). Distintas MAP-quinasas participan en la transducción de señales responsables de la inducción de proliferación y supervivencia en linfocitos T, entre ellas, la quinasa regulada por señales extracelulares-1 (ERK-1, del inglés abreviado, *extracellular signal-regulated-kinase*) y ERK-2, que contribuyen positivamente a la activación celular y producción de IL-2 tras la estimulación del TCR revisado en^{153,154}.

Aunque los mecanismos moleculares que subyacen tras la inducción y el mantenimiento del estado de anergia no se han definido con exactitud, sabemos que se relacionan con defectos en el acoplamiento entre la activación del TCR y los eventos tempranos de señalización, como activación de ZAP-70, JNK y ERK (revisado en¹⁵⁵⁻¹⁵⁷). Concretamente, se ha descrito que las células T anérgicas presentan una baja capacidad de activación de ERK-1/2 tras la estimulación antígeno-específica^{154,157,158}.

ERK-1 y ERK-2 llegan a activarse plenamente cuando son fosforiladas en residuos de treonina y tirosina por la acción de enzimas específicas denominadas quinasas de MAP-quinasas (en inglés abreviado, MKK). Se ha descrito que los intermediarios y reguladores directos de la ruta de FAS, FADD, C-8 y FLIP ejercen un papel fundamental en la proliferación de las células T. Varios trabajos han relacionado la sobre-expresión de estas moléculas con la regulación positiva de la activación de ERK-1/2. En respuesta a la estimulación por TCR, la sobre-expresión de c-FLIP_L en células Jurkat y células T primarias procedentes de ratones transgénicos para FLIP, está vinculada a una mayor fosforilación de la MAP-quinasa ERK¹⁵⁰. Además, la expresión constitutiva de FADD o C-8 en células NIH3T3 y células HeLa permite una mayor y más sostenida fosforilación de ERK en respuesta a TNF, ligado a una mayor capacidad proliferativa¹⁵⁹. En base a la alta respuesta proliferativa de las células T deficientes en FAS y su dependencia de la

activación de C-8, así como los altos niveles de expresión de FADD y FLIP tras la estimulación repetida, decidimos explorar la dinámica de fosforilación de ERK-1/2 en células T CD4⁺ *lpr* y control durante la activación secundaria con Con A.

El análisis de la cinética de fosforilación de ERK por *Western Blot* durante la estimulación secundaria nos reveló que, en ausencia de FAS, las células T CD4⁺ presentaban una fosforilación más intensa de ERK-1 (p42) y ERK-2 (p44) (Fig.21A).

Para comprobar la relevancia funcional de la mayor fosforilación de ERK en el fenotipo hiperproliferativo de las células T *lpr*, tratamos las células con el inhibidor de la fosforilación de ERK UO126 (10 μ M). Observamos que el tratamiento con UO126 tenía como consecuencia un gran descenso en la capacidad proliferativa de las células T *lpr*, en comparación con las células tratadas con DMSO (Fig.21B, panel superior). En las células T control el tratamiento con UO126 provocaba también una bajada en la proliferación, sin embargo, los datos revelaban que el efecto era proporcionalmente mucho mayor en el caso de las células T *lpr* que en el caso de las células control (Fig.21B, panel inferior). Estos datos confirmaban que la ausencia de FAS permitía una mayor activación de ERK-1 y ERK-2, lo que favorecía una mayor respuesta proliferativa en las células T CD4⁺ *lpr*.

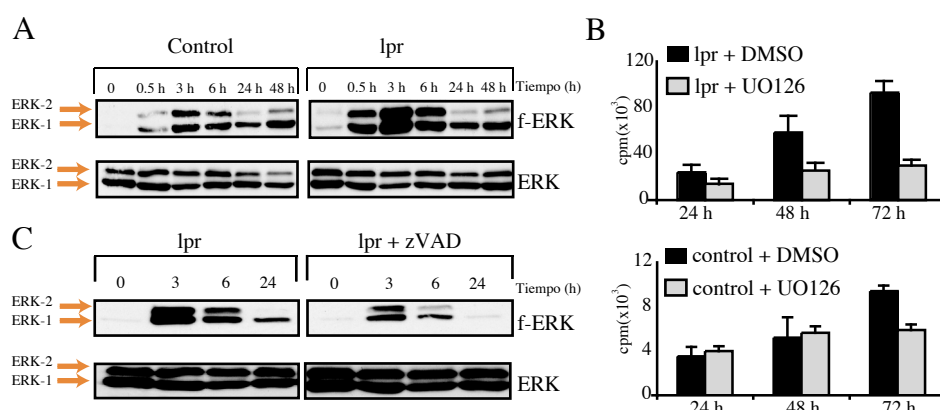


Figura 21. FAS regula negativamente la fosforilación de ERK-1/2 durante la estimulación secundaria con Con A. (A) Análisis por *Western Blot* de la cinética de fosforilación de ERK-1/2 en lisados de células T CD4⁺ control y *lpr* obtenidos a los tiempos indicados de la segunda estimulación con Con A. Todos los lisados celulares proceden de células vivas purificadas por centrifugación en un gradiente de Ficoll. (B) Cinética de incorporación de T[H³] en células T CD4⁺ *lpr* (panel superior) y control (panel inferior) durante la estimulación secundaria con Con A en presencia del inhibidor específico de la fosforilación de ERK UO126 (10 μ M). (C) Análisis por *Western Blot* de la cinética de fosforilación de ERK-1/2 en lisados de células T CD4⁺ *lpr* estimuladas con Con A, o con Con A + zVAD (200 μ M).

Hemos descrito que la proliferación de las células *lpr* es dependiente de la activación de caspasas. Quisimos comprobar si el incremento en la fosforilación de ERK-1/2 estaba subordinado a la actividad caspasa. Simultáneamente a la estimulación secundaria con Con A tratamos las células *lpr* T CD4⁺ con zVAD. Comprobamos que como consecuencia del tratamiento con zVAD, se producía una disminución en los niveles de fosforilación de ERK-1/2 en las células T *lpr* (Fig.21C).

En conjunto, los datos descritos indicaban que, tras la activación secundaria, la proliferación de las células T CD4⁺ requiere la activación de NF- κ B y ERK-1/2. Hemos comprobado que en ausencia de FAS las células T presentan una mayor capacidad proliferativa, asociada a una hiperactivación de NF- κ B y ERK-1/2 dependiente de la activación de caspasas. Por tanto, los resultados sugieren que FAS, además de inducir apoptosis, puede ejercer un papel fundamental para la homeostasis de las células T activadas, regulando negativamente la actividad de la C-8 necesaria para la activación de NF- κ B y ERK-1/2 tras la estimulación del TCR.

4. Papel de FAS en el control del ciclo celular

El ciclo celular se puede definir como el conjunto de procesos que, en último término, están implicados en la división celular. Los componentes moleculares que gobiernan y coordinan la división física de la célula constituyen la maquinaria del ciclo celular (revisado en^{105,106}). Defectos en la expresión de moléculas esenciales para el control del ciclo celular como p21, E2F2 o Gadd45, tiene como consecuencia un fenotipo hiperproliferativo de las células T *in vitro* en *vivo*^{109,110,112,114,115}.

Los datos de dilución de fluorescencia de CFSE confirman que, en ausencia de FAS, las células T soportan un mayor número de divisiones tras la activación secundaria (Fig.7A). Además, en los sistemas libres de apoptosis que hemos descrito, la alta proliferación de las células deficientes en FAS se asocia con un acúmulo de células en fase de Síntesis y Mitosis (Fig.7, 8 y 9). Dada la alta capacidad replicativa que las células T *lpr* presentaban tras la activación secundaria, decidimos definir el efecto de la falta de FAS sobre la maquinaria que controla directamente el ciclo celular.

Las moléculas que controlan la transición entre las distintas fases del ciclo celular son las quinasas dependientes de ciclinas (en inglés abreviado, CDKs). Las CDKs son serina/treonin quinasas que forman complejos heterodiméricos con las ciclinas, que a su vez funcionan como subunidades reguladoras. La expresión de las ciclinas varía a lo largo del ciclo celular. En ausencia de las ciclinas, las CDKs permanecen inactivas. Tras la formación de los complejos ciclina/CDK, se activan adquiriendo la actividad quinasa necesaria para favorecer la transición entre las distintas fases del ciclo celular.

La actividad de la CDK2 es fundamental para la correcta transición hacia la fase de Síntesis. Mediante ensayos quinasa medimos la capacidad de fosforilación de la Histona H1 en los inmunoprecipitados de CDK2, obtenidos a partir de los extractos proteicos procedentes de células T *lpr* y control tras la activación secundaria (en todos los experimentos descritos se purificaron células vivas con Ficoll para la obtención de los extractos). Como resultado y en concordancia con los datos de proliferación, observamos un incremento en la actividad quinasa de CDK2 en las células T *lpr* a lo largo de la estimulación secundaria (Fig.22A).

Coincidiendo con el pico de proliferación de las células T deficientes en FAS (Fig.4D, panel inferior), la actividad quinasa de la CDK2 alcanzaba un máximo de activación a las 72 h de la estimulación secundaria.

Analizamos por *Western Blot* la expresión de las principales ciclinas integrantes de los complejos ciclinas/CDK implicados en el control del ciclo celular en células T. No detectamos diferencias de expresión de Ciclina E, Ciclina D3 o Ciclina A, entre células T CD4⁺ *lpr* y control durante la segunda estimulación con Con A (Fig.22B).

La actividad de las CDKs no sólo depende de la abundancia de su ciclina correspondiente, ya que también es regulada por los inhibidores específicos de CDKs. Analizamos el patrón de expresión en células T CD4⁺, durante una estimulación secundaria con Con A, de los inhibidores de ciclo celular p16, p19, p21 y p27. No detectamos diferencias de expresión de p16 y p19 entre células T control y deficientes en FAS (Fig.22C, panel izquierdo). Sin embargo, en el caso de células T *lpr*, fue detectado un claro aumento de expresión de p27 a las 48 h de la estimulación, con un pico de expresión las 72h (Fig.22C, panel derecho). Paralelamente, observamos que a las 72h de la segunda estimulación era patente un descenso significativo en los niveles de expresión de p21 en el caso de las células deficientes en FAS (Fig.22C, panel derecho).

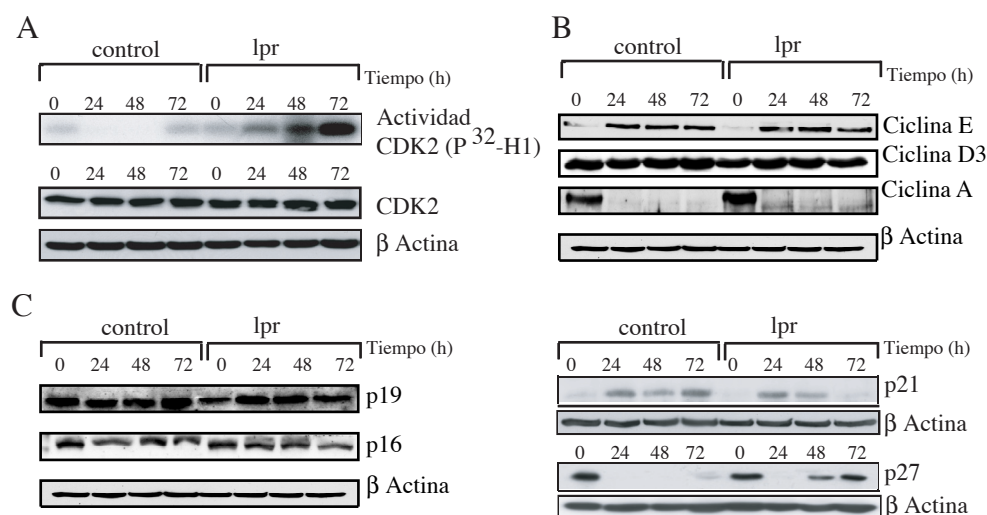


Figura 22. Niveles de expresión y estado de activación de reguladores esenciales para el control del ciclo celular en células T CD4⁺ control y *lpr* durante la segunda estimulación con Con A. (A) Cinética de actividad quinasa CDK2 durante la segunda estimulación con Con A (panel superior) (Como sustrato para el ensayo quinasa se ha usado Histona H1). Expresión total de CDK2 por *Western Blot* (panel inferior). (B) Cinética de expresión por *Western Blot* de Ciclina A, D3 y E durante la segunda estimulación con Con A. (C) Cinética de expresión por *Western Blot* de los inhibidores de ciclo celular p19, p16 (panel izquierdo), p21 y p27 (panel derecho). Todos los lisados celulares proceden de células vivas purificadas por centrifugación en un gradiente de Ficoll.

Tanto p21 como p27 son inhibidores específicos que modulan negativamente la actividad quinasa de la CDK2 (revisado en ^{105,160}). Sin embargo, en células T CD4⁺ bajo condiciones de estimulación repetida, p27 parece no ejercer un papel fundamental en la regulación negativa de la actividad CDK2, ya que, el incremento progresivo en la actividad quinasa a lo largo de la estimulación secundaria tiene lugar en concomitancia con el aumento de p27. Además, a pesar del alto nivel de expresión de este inhibidor del ciclo celular, el máximo de actividad CDK2 (que coincide con el pico de proliferación de las células *lpr*) se produce a las 72 h, paralelamente a la bajada de p21. Estos datos sugieren que la disminución de expresión de p21 y no el nivel de expresión de p27, puede ser un requisito para alcanzar los altos niveles de actividad CDK2 registrados en las células *lpr* en los últimos estadios de la activación secundaria. En concordancia con esto, en nuestro laboratorio hemos demostrado que p21 es un factor esencial para el control de la proliferación de las células T¹¹⁰.

Hemos estudiado el patrón de respuesta de las células TCD4⁺ de ratones C57BL/6-p21^{-/-} en condiciones de estimulación repetida *in vitro*. Al igual que el caso de las células T deficientes en FAS, las células T deficientes en p21 mostraban una clara ventaja proliferativa, respecto a las células T control, como consecuencia de la estimulación repetida con Con A tras un periodo de seis días de expansión con IL-2 (Fig.23B y ¹¹⁰). Hay que resaltar que las células T CD4⁺ deficientes en p21 presentaban la misma sensibilidad a la inducción de apoptosis que las células T control¹¹⁰ (dato no mostrado). Curiosamente la deficiencia de expresión de p21 en la activación

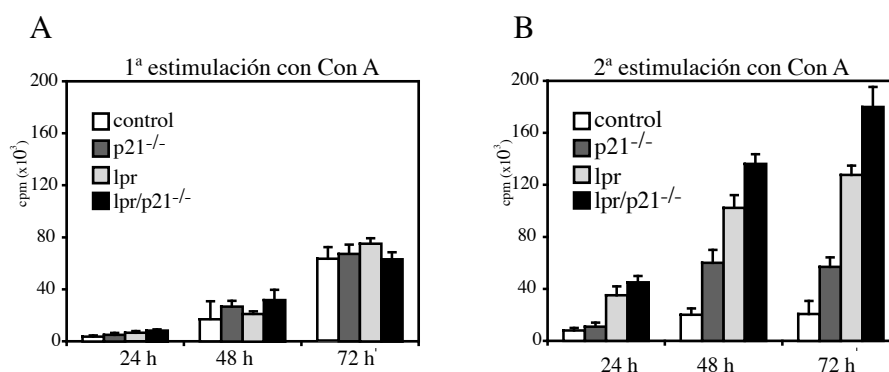


Figura 23. Papel de p21 en la regulación de la proliferación secundaria. (A) Cinética de incorporación de T[H³], durante la estimulación primaria con Con A, de las células T CD4⁺ procedentes del bazo de ratones control, p21^{-/-}, *lpr* y *lpr/p21^{-/-}* (todos en fondo C57BL/6) (los valores representan la media \pm DS, n=3). Se muestra un experimento representativo de 3 realizados de forma independiente. (B) Cinética de incorporación de T[H³] durante la estimulación secundaria con Con A.

primaria no tiene como consecuencia una ventaja proliferativa (Fig.23A), indicando que no sólo la expresión de p21 es requerida para la inhibición de la proliferación, sino que, hay mecanismo adicionales que condicionan la actividad de p21 como inhibidor la replicación de las células T.

Para profundizar en el papel de p21 en el control de la proliferación de las células T *lpr* generamos ratones doble deficientes *lpr/p21^{-/-}* en fondo C57BL/6. El análisis *in vitro* de las características proliferativas de las células T CD4⁺ procedentes de estos ratones, reveló que

la ausencia de p21 incrementaba todavía más la elevada respuesta replicativa de las células T deficientes en FAS tras la estimulación repetida con Con A (Fig.23B). No se detectaron diferencias en la sensibilidad a apoptosis entre ambos tipos de células (dato no mostrado).

Estudiamos el patrón de expresión de p21 en el protocolo corto de estimulación repetida (ver Material y Métodos). Análogamente a lo descrito en el protocolo largo, a las 48 h de estimulación secundaria se producía un notable descenso en los niveles de p21 en las células *lpr* (Fig.24A). Este descenso en la expresión de p21 iba acompañado de un incremento en la actividad quinasas CDK2 en las células deficientes en FAS (Fig.24D, panel inferior).

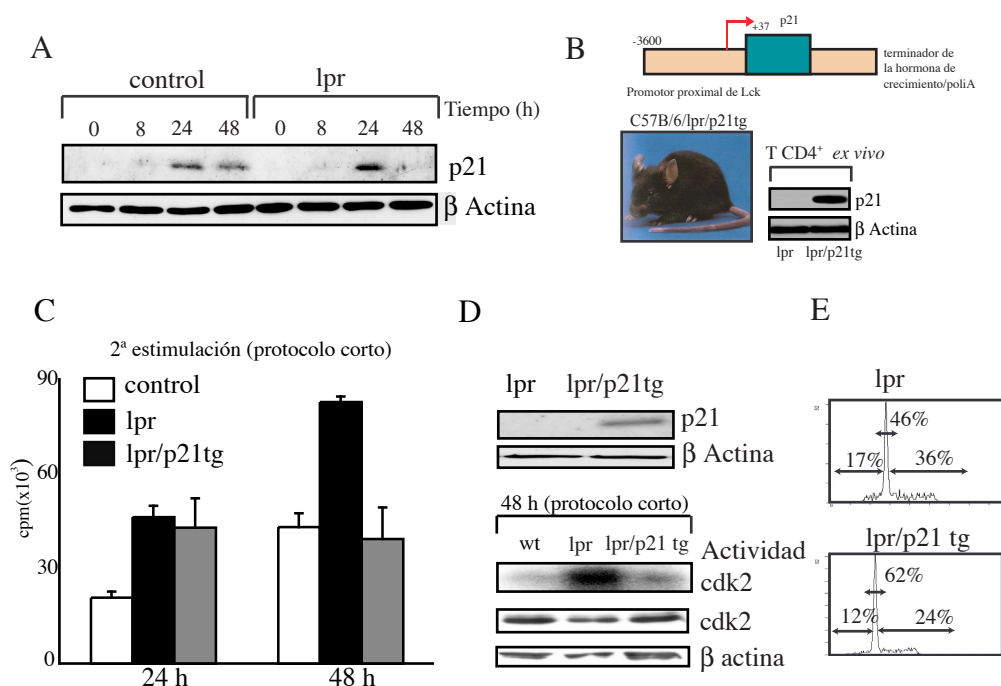


Figura 24. La sobre-expresión de p21 inhibe la proliferación de las células TCD4⁺ *lpr* durante la estimulación secundaria con Con A. (A) Cinética de expresión de p21 durante la segunda estimulación con Con A realizada según el protocolo corto de estimulación repetida (las células T CD4⁺ son purificadas del bazo de ratones control y *lpr* por selección negativa y estimuladas durante 24 h con Con A. A continuación se expanden con IL-2 durante otras 24 h. Al término de la expansión se re-estimulan con Con A (3 µg/ml) durante 48 h, estimulación secundaria). Los lisados celulares se han obtenido purificando células vivas con Ficoll. (B) Expresión constitutiva de p21 en ratones *lpr/p21tg* en fondo C57BL/6. La expresión del transgén está controlada por el promotor de *Lck*, quedando restringida al linaje T. Se muestra la expresión del transgén en células T CD4⁺. (C) Cinética de incorporación de T[H³] por células T CD4⁺ procedentes de ratones control, *lpr* y *lpr/p21tg* durante la estimulación secundaria con Con A realizada según el protocolo corto de estimulación repetida (media ± DS, n=3). Se muestra un experimento representativo de 3 independientes. (D) Expresión de p21 en células T CD4⁺ *lpr* y *lpr/p21tg* a las 48 h de la estimulación secundaria con Con A (protocolo corto de estimulación repetida) (panel superior); actividad quinasas CDK2 a las 48 h de la estimulación secundaria con Con A (protocolo corto de estimulación repetida). (E) Perfil de ciclo celular en células T CD4⁺ *lpr* y *lpr/p21tg* a las 24 h de la estimulación secundaria con Con A, según el protocolo abreviado de estimulación repetida.

Para confirmar el papel de p21 en la proliferación de las células T *lpr* cruzamos ratones C57B/6-*lpr* con ratones C57B/6/p21tg, para generar ratones C57BL/6-*lpr*-p21tg (en adelante *lpr*/p21tg). Estos ratones expresan constitutivamente p21, pero la expresión del transgén de p21 está controlada por el promotor de *lck*, quedando así restringida al linaje T¹²¹ (Fig.24B). Analizamos la respuesta proliferativa *in vitro* de las células T CD4⁺ procedentes de ratones *lpr*/p21tg. Aplicando el protocolo corto de estimulación repetida hemos comprobado que la sobre-expresión del p21 en las células T CD4⁺ deficientes en FAS, tiene como consecuencia el control de la sobre-proliferación *in vitro* de las células *lpr* (Fig.24C). Además, en concordancia con lo descrito anteriormente, la expresión del transgén de p21 en las células T CD4⁺ procedentes de los ratones *lpr*/p21tg limita la hiperactivación de CDK2 observada a las 48 h de estimulación secundaria (Fig.24D). No detectamos diferencias en la inducción de apoptosis *in vitro* entre las células T CD4⁺ *lpr* y *lpr*/p21tg a consecuencia de la sobre-expresión de p21 (Fig.24E).

Los datos obtenidos con las células T doble deficientes *lpr*/p21^{-/-} y *lpr*/p21tg, confirman que los niveles de expresión de p21 en las células T CD4⁺ *lpr* son fundamentales para la expansión de la respuesta proliferativa *in vitro* en condiciones de estimulación repetida.

Finalmente, comprobamos que la expresión de p21 en las células T control se mantenía más allá del periodo de estimulación. Durante la expansión con γ IL-2 posterior a la estimulación secundaria, etapa durante la cual las células deficientes en FAS presentan una ventaja proliferativa clara (Fig.9), los niveles de p21 en las células T control continúan siendo elevados en comparación a las células *lpr* (Fig.25A). Durante la estimulación primaria no se detectaron diferencias en la expresión de p21 entre células control y *lpr* (Fig.25B).

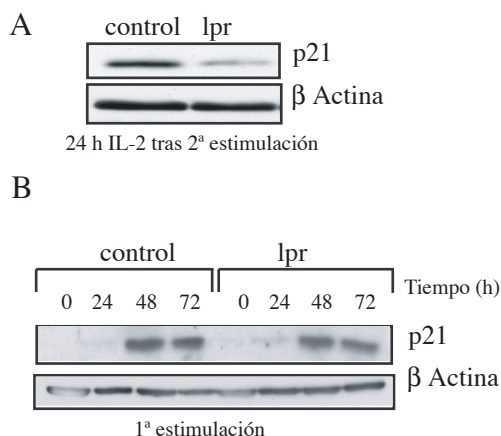


Figura 25. Expresión de p21 durante la primera estimulación y tras 24 h de expansión con γ IL-2 tras la activación secundaria (A) Expresión de p21 por Western Blot a las 24 h del periodo de expansión con γ IL-2 que sigue a la estimulación secundaria con Con A (B) Cinética de expresión de p21 durante la estimulación primaria con Con A de células T CD4⁺ control y *lpr*.

Los datos sugieren que la señalización mediada por FAS, en las células T CD4⁺ que han sobrevivido al proceso apoptótico, estabiliza los niveles de p21 a partir de la segunda estimulación. La estabilidad en la expresión de p21 en los últimos estadios de activación favorece la inhibición de la actividad CDK2, limitando la proliferación de las células T que sobreviven a la apoptosis.

Anteriormente hemos mostrado que, en las células deficientes en FAS, el fenotipo hieperproliferativo es dependiente de la actividad caspasa. El tratamiento con inhibidores farmacológicos de caspasas limita la sobre-proliferación de las células *lpr* asociado a un control de la activación de NF- κ B y ERK-1/2. Se ha descrito que la activación de ciertas caspasas, como la Caspasa-3, provoca la degradación de p21 y el consecuente aumento de la actividad CDK2¹⁶¹⁻¹⁶³. Ya que en las células deficientes en FAS tiene lugar una disminución en los niveles de expresión de p21, que favorece la proliferación de las células T, decidimos investigar si este descenso era dependiente de la actividad caspasa. Para ello, tratamos la células *lpr* con zVAD durante la estimulación secundaria. Por *Western Blot* comprobamos que el tratamiento con zVAD bloqueaba la disminución de p21 registrada, a las 72 h de la segunda estimulación, en las células T *lpr* (Fig.26, panel superior). Como consecuencia y en concordancia con la inhibición de la proliferación observada tras el tratamiento con inhibidores de actividad caspasa (Fig.17), los niveles de expresión de p21, a las 72 h de la segunda estimulación, eran mayores en las células *lpr* tratadas con zVAD (Fig.26, panel inferior).

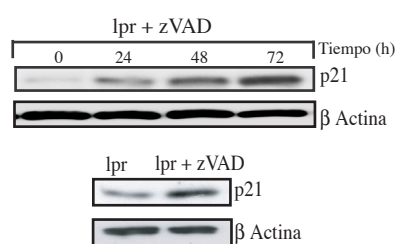


Figura 26. La regulación negativa de p21 en células T CD4⁺ *lpr* tras la activación secundaria es dependiente de la actividad caspasa. Cinética de expresión de p21 por *Western Blot* durante la segunda estimulación con Con A en células T CD4⁺ *lpr* tratadas con zVAD (200 μ M) (panel superior); comparativa de la expresión de p21 a las 72 h de la estimulación secundaria con Con A en células *lpr* tratadas con zVAD respecto a células *lpr* sin tratar (panel inferior).

Como resumen de este bloque de resultados podemos concluir que, en las células T deficientes en FAS, se produce una disminución en la expresión de p21 dependiente de la activación de caspasas. La bajada en p21 permite una mayor activación de la CDK2, lo que contribuye a aumentar la repuesta proliferativa de las células *lpr* en los últimos estadios de la activación secundaria.

5- Inhibición del fenotipo autoinmune de los ratones *lpr* mediante el control de la proliferación de las células T

Hemos demostrado a lo largo de esta Tesis que, *in vitro* e *in vivo*, FAS regula negativamente el estado de activación y la capacidad de proliferación de las células T. Ya que las anomalías apoptóticas no explican completamente el fenotipo de los ratones *lpr*, nos propusimos comprobar si el exceso de activación y proliferación de las células T deficientes en FAS, contribuía al desarrollo de la patología autoinmune asociada a la mutación *lpr*. Ya que p21 actúa como un regulador negativo de la proliferación de las células T, intentamos reducir la hiperproliferación de

las células T *lpr* sobre-expresando p21 de forma específica en células T. De esta forma podríamos comprobar si inhibiendo la proliferación excesiva de las células T *lpr* se limitaba la severidad de la enfermedad. Si nuestra hipótesis era cierta, a pesar de la resistencia a apoptosis característica de las células T *lpr*, la sobre-expresión de p21 en las células T nos permitiría controlar el exceso de activación y proliferación *in vivo* y con ello la gravedad de la enfermedad.

Como hemos comentado, generamos una línea C57BL/6-*lpr*/p21tg cruzando ratones C57B/6-*lpr* con ratones C57B/6/p21tg. Generamos también ratones *lpr*/p21tg en fondo MRL (MRL-*lpr*/p21tg), por retrocruce de ratones C57B/6/p21tg con ratones MRL/*lpr* durante más de ocho generaciones. En estos ratones la expresión del transgen de p21 está controlada por el promotor de *lck*, quedando así restringida al linaje T. La expresión del transgén en la colonia se ha mantenido en heterocigosis.

Analizamos la proliferación *in vivo*, mediante cuantificación de incorporación de BrdU, de las células T CD4⁺, T CD8⁺ y células T dobles negativas (Thy1.1⁺B220⁺CD4⁻CD8⁻) de los ganglios linfáticos cervicales de ratones *lpr* y *lpr*/p21tg. Comprobamos que, al igual que ocurría *in vitro*, la sobre-expresión de p21 en las células T *lpr* controlaba la sobre-proliferación *in vivo* de las células deficientes en FAS (Fig. 27).

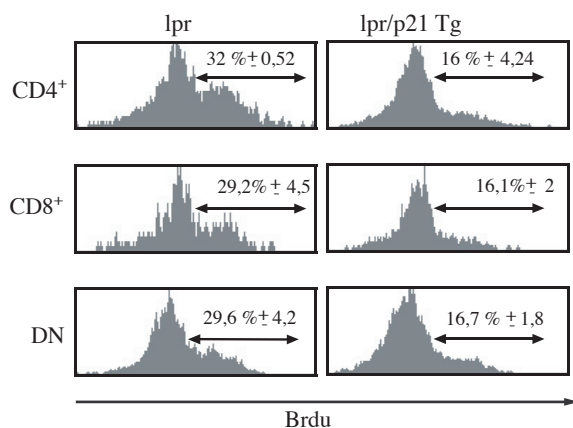


Figura 27. La sobre-expresión de p21 inhibe la proliferación de las células T *lpr* *in vivo*. Cuantificación por citometría de flujo del porcentaje de incorporación *in vivo* de BrdU en las células T CD4⁺, T CD8⁺ y células T dobles negativas (DN) (Thy1.2⁺CD4⁻CD8⁻B220⁺) procedentes de los ganglios cervicales de ratones *lpr* y *lpr*/p21tg de dos meses de edad (los valores se corresponden con la media ± la DS, n=3). Se muestra un experimento representativo de 3.

A continuación, analizamos el efecto de la sobre-expresión de p21 en los diferentes parámetro fenotípicos que definen la patología autoinmune ligada a la deficiencia en FAS. Los datos presentados se corresponden con el análisis de los ratones MRL-*lpr*/p21tg, pero resultados similares se encontraron al estudiar la cepa C57B/6/*lpr*/p21tg (no mostrados). Como controles *lpr* se utilizaron hermanos de camada MRL-*lpr*. Como cepa control se utilizaron ratones MRL-mp, que no presentan defectos en la expresión de FAS.

El análisis del fenotipo *in vivo* de los ratones hembra MRL-*lpr*/p21tg de entre 4 y 6 meses de edad, reveló una gran reducción en el grado de desarrollo de adenopatía respecto a los ratones MRL-*lpr* (Fig.28A, panel izquierdo) (n=10, p =1,7x10⁻⁸). Aunque la reducción del tamaño era general en todos los ganglios, se utilizaron los cervicales como ganglios representativos (Fig.28A, panel inferior). Los mismos resultados se obtuvieron al analizar ratones machos (dato no mostrado)

Analizamos la composición celular de los ganglios cervicales en ambos tipos de ratones. Como consecuencia de la expresión del transgén de p21 y en consonancia con los datos de proliferación, los ratones MRL-*lpr*/p21tg presentaban una gran reducción en el número absoluto de células T (Fig.28B) ($n=10$, $p=2,6 \times 10^{-7}$).

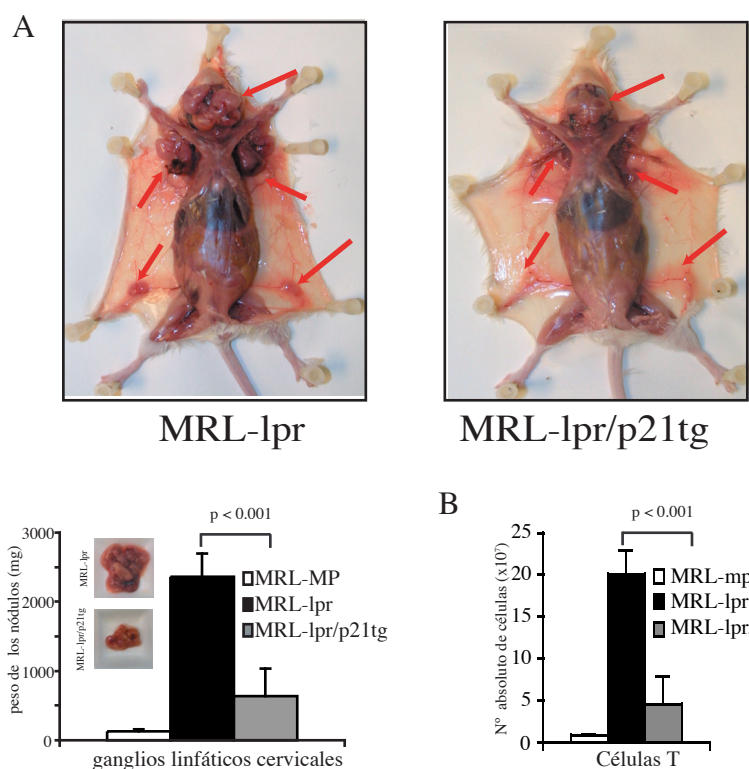


Figura 28. Reducción de la adenopatía en los ratones MRL-*lpr*/p21tg. (A)

Fotografías de necropsias de ratones MRL-*lpr* y MRL-*lpr*/p21tg, hembras de 6 meses de edad, mostrando la reducción generalizada del tamaño de los ganglios linfáticos a consecuencia de la expresión del transgén de p21, panel superior; panel inferior, pesos en mg de los ganglios cervicales de los ratones MRL-mp (control), MRL-*lpr* y MRL-*lpr*/p21tg (hembras de 4-6 meses), (los valores representan la media \pm la DS, $n=10$, $p=1,7 \times 10^{-8}$). (B) Número absoluto de células T (definidas como Thy1.2⁺) en los ganglios cervicales de los ratones MRL-mp (control), MRL-*lpr* y MRL-*lpr*/p21tg (hembras de 4-6 meses), (los valores representan la media \pm la DS, $n=10$, $p=2,6 \times 10^{-7}$).

Una de las marcas definitorias de las patologías asociadas a defectos en la expresión o señalización de FAS, en modelos animales y en humanos, es la acumulación de células T dobles negativas (Thy1.2⁺CD4⁻CD8⁻B220⁺). En los nódulos de los ratones MRL-*lpr*/p21tg encontramos un gran descenso en el porcentaje ($n=10$, $p=6,9 \times 10^{-7}$) y número absoluto de células dobles negativas ($n=10$, $p=0,0001$) con respecto a los ratones MRL-*lpr* (Fig.29A y B respectivamente). Además, el porcentaje que, dentro de las células T, representan las células dobles negativas era menor que en los ratones MRL-*lpr* ($n=10$, $p=4,24 \times 10^{-5}$), indicando que la diferenciación hacia este fenotipo aberrante estaba limitada en el caso de los MRL-*lpr*/p21tg (Fig.29C).

La acumulación de células T de memoria *in vivo* (definidas por citometría de flujo como CD4⁺CD44^{alto},CD62L^{bajo}), es una de las constantes en los modelos animales de autoinmunidad. En los ganglios linfáticos cervicales de los ratones MRL-*lpr*/p21tg, encontramos un acusado descenso del número absoluto de células T CD4⁺ de memoria (Fig.29D) ($n=8$, $p=0,0004$). Hemos comprobado que, dentro de la población total de células T CD4⁺, el porcentaje que suponen las

células T CD4⁺ de memoria es menor en el caso de los ratones MRL-*lpr*/p21tg comparado con los ratones MRL-*lpr* (Fig.29E) (n=8, p=0,002). Además, el porcentaje de células T CD4⁺ activadas (CD4⁺CD69⁺) dentro de la población total de células TCD4⁺ era menor a consecuencia de la expresión de p21 (Fig.29F) (n=8, p=0,001). Estos últimos resultados ratifican los hallazgos de nuestro laboratorio acerca del papel de p21 en el control específico de la proliferación y activación de las células T CD4⁺ de memoria¹¹⁰ y sugieren que el control de esta población es esencial para el establecimiento de Tolerancia Periférica.

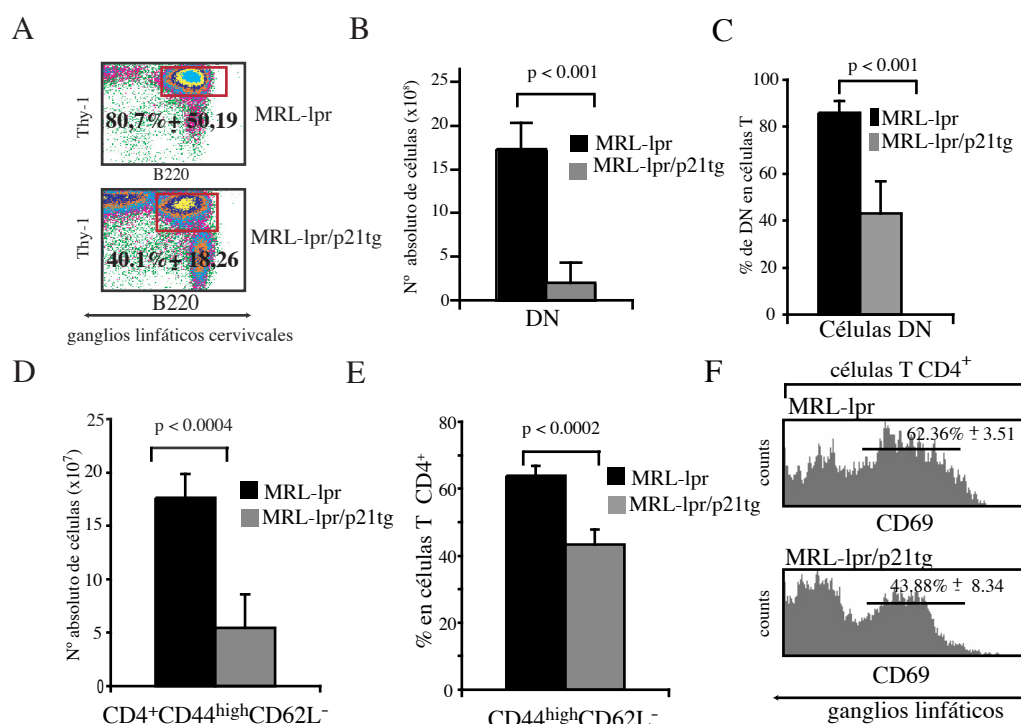


Figura 29. Reducción de la acumulación de células T dobles negativas y células T CD4⁺ de memoria en ratones MRL-*lpr*/p21tg. (A) Porcentaje de células T dobles negativas (definidas por citometría de flujo mediante marcaje en 4 colores como Thy1.2⁺CD4⁻CD8⁻B220⁺) en los ganglios linfáticos cervicales de ratones MRL-*lpr* y MRL-*lpr*/p21tg hembras de 4-6 meses de edad (los valores representan la media ± la DS, n=10, p=6,9x10⁻⁷) (B) Número absoluto de células T doble negativas en los ganglios linfáticos cervicales de ratones hembras de 4-6 meses de edad MRL-*lpr* y MRL-*lpr*/p21tg (los valores representan la media ± la DS, n=10, p=0,0001). (C) Porcentaje de células T dobles negativas dentro del total de la población de células T en los ganglios linfáticos cervicales de ratones hembras de 4-6 meses de edad MRL-*lpr* y MRL-*lpr*/p21tg (los valores representan la media ± la DS, n=10, p=4,24x10⁻⁵) (D) Número absoluto de células T CD4⁺ de memoria (definidas por citometría de flujo mediante marcaje en 3 colores como CD4⁺CD44^{high}CD62L⁻) en los ganglios linfáticos cervicales de ratones hembras de 4-6 meses MRL-*lpr* y MRL-*lpr*/p21tg (los valores representan la media ± la DS, n=8, p=0,0004). (E) Porcentaje de células T CD4⁺ de memoria dentro del total de la población de células T CD4⁺ en los ganglios linfáticos cervicales de ratones hembras de 4-6 meses MRL-*lpr* y MRL-*lpr*/p21tg (los valores representan la media ± la DS, n=8, p=0,002) (F) Porcentaje de células CD69⁺ en la población de células T CD4⁺ en los ganglios linfáticos cervicales de ratones hembras de 4-6 meses de edad MRL-*lpr* y MRL-*lpr*/p21tg (los valores representan la media ± la DS, n=8, p=0,001).

Cuando analizamos que ocurría con la población de células B ($B220^{+}CD19^{+}Thy1.2$) en los ganglios linfáticos cervicales de ambos tipos de ratones, no encontramos diferencias significativas en número absoluto entre ratones MRL-*lpr*/p21tg y ratones MRL-*lpr* (Fig.30A). Sin embargo, el análisis por citometría de flujo de la expresión en membrana de IgG en las células B, nos mostró que, el porcentaje de células $B220^{+}CD19^{+}IgG^{alto}$, era mayor en el caso de los ratones MRL-*lpr*/p21tg (Fig.30B) ($n=7$, $p=1,39 \times 10^{-5}$), lo que redundaba en un mayor número absoluto de células B IgG^{alto} (Fig.30C) ($n=7$, $p=0,77 \times 10^{-3}$). Esto nos indicaba que en los ganglio linfáticos de los ratones MRL-*lpr*/p21tg, la activación de células B dependiente de células T se veía limitada debido a la sobre-expresión de p21.

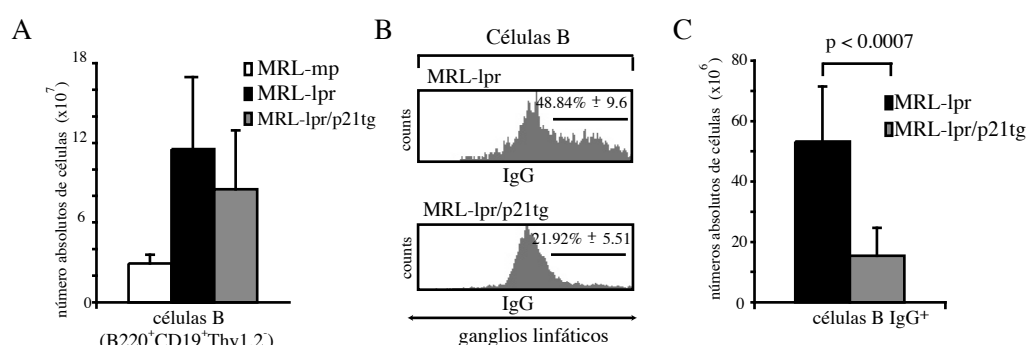


Figura 30. Reducción en la acumulación de células B IgG^{+} en los ratones MRL-*lpr*/p21tg. (A) Número absoluto de células B (definidas por citometría de flujo como $B220^{+}CD19^{+}Thy1.2$) en los ganglios linfáticos cervicales de ratones hembras de 4-6 meses de edad MRL-mp, MRL-*lpr* y MRL-*lpr*/p21tg (los valores representan la media \pm la DS, $n=7$, $p>0,1$). (B) Porcentaje de células IgG^{+} en la población de células B de los ganglios linfáticos cervicales de ratones hembras de 4-6 meses MRL-*lpr* y MRL-*lpr*/p21tg (los valores representan la media \pm la DS, $n=8$, $p=1,39 \times 10^{-5}$). (C) Número absoluto de células B IgG^{+} en los ganglios linfáticos cervicales de ratones hembras de 4-6 meses MRL-*lpr* y MRL-*lpr*/p21tg (los valores representan la media \pm la DS, $n=7$, $p=0,77 \times 10^{-3}$).

En ratones, una de las características diagnósticas del proceso autoinmune asociado a la falta de FAS, es la presencia de altos títulos en suero de anticuerpos anti-ADN de doble cadena. Medimos por ELISA los niveles séricos de IgG anti-ADN en ratones MRL-*lpr* y MRL-*lpr*/p21tg a los cuatro meses de edad. Comprobamos que los niveles de IgG anti-ADN en el suero de los ratones MRL-*lpr*/p21tg eran tres veces menores que los obtenidos en los MRL-*lpr* ($n=11$, $p=2,6 \times 10^{-5}$) (Fig.31A). Los mismo resultados fueron obtenidos cuando analizamos por separado machos y hembras.

Uno de los procesos patológicos más representativos del fenotipo MRL-*lpr* radica en el desarrollo de lesiones glomerulares, caracterizadas por el depósito de inmunocomplejos e infiltrados de células inflamatorias. Mediante inmunofluorescencia en criocortes de riñón, comprobamos que en los ratones MRL-*lpr*/p21tg hembras de cuatro meses de edad, los niveles detectados de IgGs eran menores en comparación con los ratones MRL-*lpr* (Fig.31B, panel izquierdo). La tinción en criocortes con anticuerpos anti-CD4 demostró que en los ratones MRL-*lpr*/p21tg, el tamaño de los infiltrados perivasculares de células T $CD4^{+}$ también se veía reducido

(Fig.31B, panel central). El reclutamiento y activación leucocitario mediado por receptores Fc constituye una de las principales vías de lesión tisular e inflamación inducida por anticuerpos, los neutrófilos y macrófagos expresan receptores de superficie específicos para los fragmentos Fc de las cadenas pesadas γ y por tanto pueden unirse y ser activados por los anticuerpos IgG. De acuerdo con los menores niveles de IgGs presentes en los glomérulos de los ratones MRL-*lpr*/p21tg, mediante inmunofluorescencia en criocortes de riñón con anticuerpos anti-F4/80 (específico de macrófagos), comprobamos que el reclutamiento de macrófagos a la zona de lesión glomerular era menor en el caso de los ratones MRL-*lpr*/p21tg (Fig.31B, panel derecho). El análisis anatómo-patológico de secciones parafinadas de riñones MRL-*lpr* y MRL-*lpr*/p21tg, reveló que la severidad de las lesiones renales disminuía a consecuencia de la sobre-expresión de p21 (Fig.31C).

Por tanto, los datos confirmaban que la menor proliferación linfocitaria, debida a la sobre-expresión de p21, contribuía a rebajar notablemente la gravedad de la patología autoinmune *lpr*.

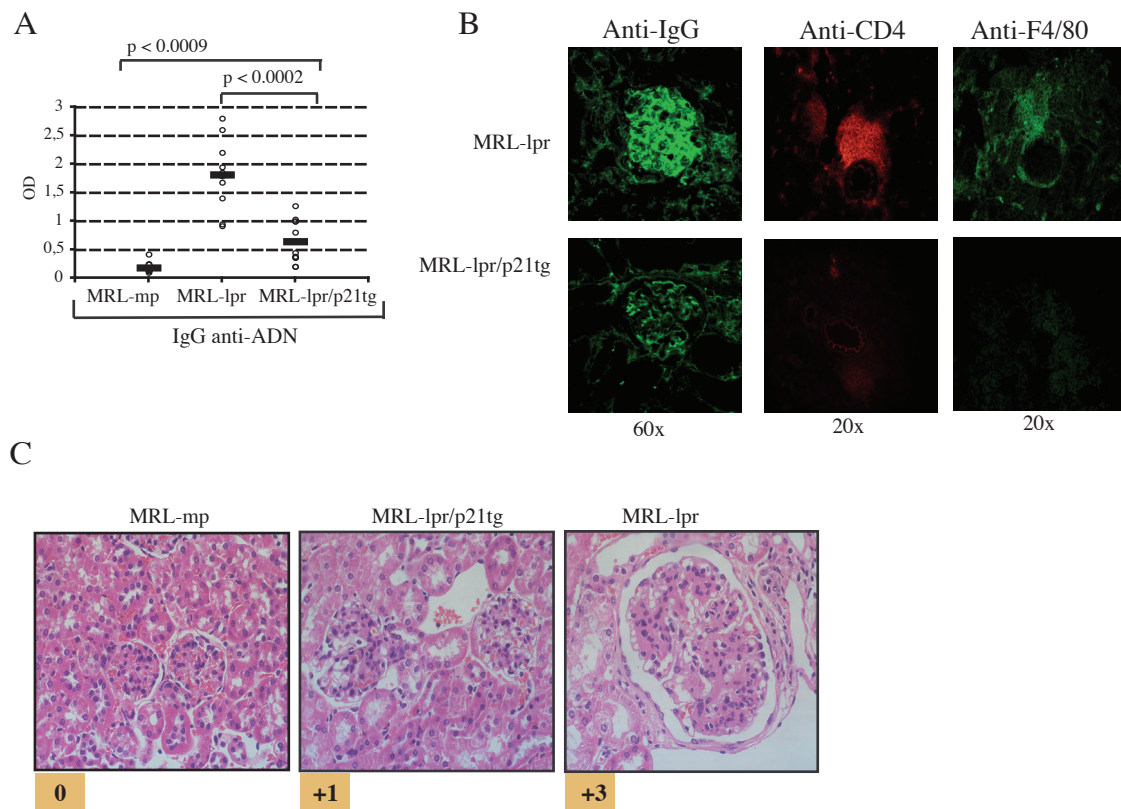


Figura 31. Reducción de la severidad de la patología autoinmune MRL-*lpr* debido a la sobre-expresión de p21.

(A) Niveles relativos de IgG anti-ADN detectados mediante ELISA en el suero de ratones MRL-mp, MRL-*lpr* y MRL-*lpr*/p21tg de 4 meses ($n=11$, $p=2,6 \times 10^{-5}$, cohortes formada por grupos de ratones con composición de machos y hembras homogéneos). (B) Inmunofluorescencia en criocortes de riñón procedentes de ratones MRL-*lpr* y MRL-*lpr*/p21tg con anticuerpos anti-IgG, anti-CD4 y anti-F4/80 (Hembras de 6 meses de edad). Se muestra un corte representativo (se evaluaron 5 riñones de forma independiente). (C) Secciones de glomérulos representativos de ratones MRL-mp, MRL-*lpr* y MRL-*lpr*/p21tg hembras de 6 meses de edad. Se muestra la clasificación del grado de glomerulonefritis según la escala de Berdem (Ver Material y Métodos).

VII. DISCUSIÓN

“we suggest it is time to reappraise the physiological functions of the death receptor CD95”

“we argue that important function of CD95 have been widely ignored and that the available data not support the conclusion that the induction of apoptosis is the sole function of CD95 in vivo”

Marcus E.Peter, Ralph C.Budd, Julie Desbarats, Stephen M. Hedrick, Anne-Odile Hueber, M.Karen Newell, Laurie B.Owen, Richard M. Pope, Juerg Tschopp, Harald Wajant, David Wallach, Robert H. Wilttrout, Martin Zörning and DavidH. Lynch. **Cell.** 129,447-450; **2007**

1. FAS controla la proliferación de las células T activadas repetidamente.

La ausencia de FAS en los ratones *lpr* tiene un gran impacto sobre la homeostasis inmunológica. La falta de FAS tiene como consecuencia el desarrollo de un complejo fenotipo, caracterizado por el desarrollo de adenopatía y la acumulación masiva de células T en los ganglios linfáticos (Fig.1), predominantemente células T Doble Negativas (CD4⁻CD8⁺TCR⁺). Además estos ratones desarrollan una enfermedad autoinmune, definida por la producción de anticuerpos anti-nucleares y el desarrollo de glomerulonefritis (Fig.3). FAS es un receptor de membrana caracterizado *in vitro* por su capacidad para inducir muerte en células T a consecuencia de la activación repetida, o tras tratamiento con anticuerpos anti-FAS (revisado en ^{18,19,21}). Se ha postulado que el desarrollo del fenotipo *lpr* se debe a un defecto apoptótico inherente a la falta de FAS^{16,22,23,28,29,164}.

Sin embargo, los defectos en muerte no son suficientes para justificar el desarrollo de autoinmunidad observado en ausencia de FAS. En ratones y humanos con defectos en la expresión de FADD o C-8, mediadores directos de la ruta de FAS, no se observa el desarrollo del cuadro patológico característico de la ausencia de FAS, a pesar de presentar los mismos defectos en inducción de apoptosis en las células T que los ratones *lpr*. Contrariamente a lo esperado, en estos modelos las células T presentan defectos en la capacidad de activación y proliferación tras estimulación antigénica, indicando que, aunque los procesos de proliferación y muerte celular son eventos aparentemente opuestos y mutuamente contradictorios, la regulación de ambos eventos puede estar sujeta a factores comunes^{82,83,88,89,165}. En base a esta discrepancia de fenotipos se ha propuesto que FAS puede ejercer alguna otra función, además de su papel proapoptótico, que resulte esencial para la homeostasis del Sistema Inmunológico^{9,83,117,165,166}.

En esta Tesis hemos demostrado que FAS regula negativamente la proliferación de las células T. Como consecuencia de la estimulación reiterada, las células T deficientes en FAS presentan un claro perfil hiperproliferativo en comparación a las células T control (Fig.4B, 4D y Fig.6A). La caracterización fenotípica de las células T CD4⁺, generadas a consecuencia del protocolo de estimulación repetida, mediante los marcadores CD44 y CD62L (que definen diferentes estadios de activación en células T CD4⁺), reveló que no había alteraciones en el proceso de diferenciación *in vitro* entre células T control y *lpr* (Fig.5), indicando que las diferencias en proliferación no residían en la generación de distintos fenotipos celulares. Dado el papel de FAS como inductor de apoptosis (Fig.4D, panel derecho), hemos centrado nuestros esfuerzos en comprobar si la ventaja replicativa de las células T *lpr* respondía a una mayor capacidad real de división de cada célula T individual debido a la ausencia de FAS, o por el contrario, era un efecto indirecto debido a la acumulación de células T resistentes a la muerte en los cultivos de células T *lpr*.

Para demostrar que debido al defecto en la expresión de FAS las células T *lpr* adquirirían un mayor ritmo replicativo que las células T control, estudiamos las características proliferativas de las células T control y deficientes en FAS en sistemas en los que el efecto de la diferente

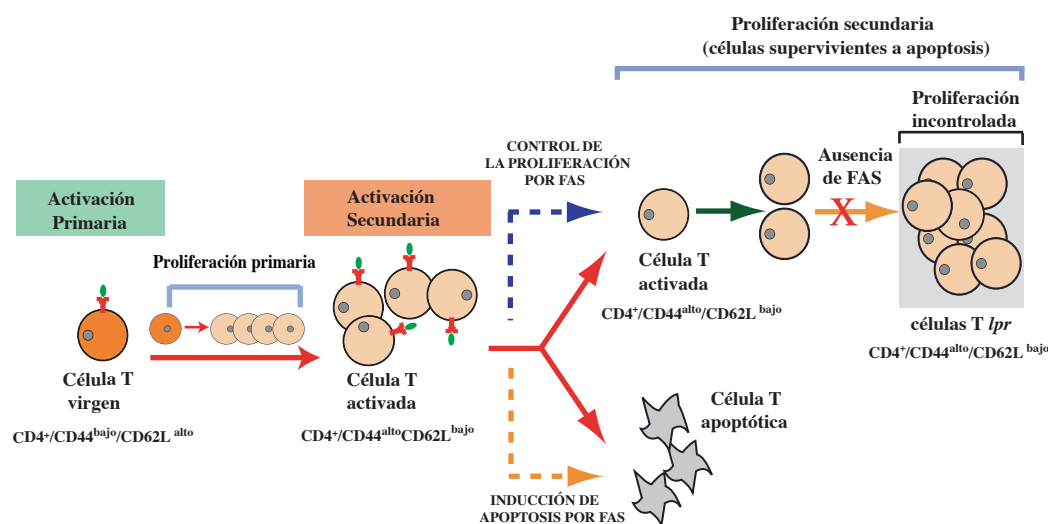
susceptibilidad a la inducción de muerte pudiera ser evitado. En este sentido, los experimentos de medida de proliferación por pérdida de intensidad de fluorescencia de CFSE (Fig.7A) demuestran que FAS controla la capacidad de división de las células T que, tras una activación secundaria, sobreviven al proceso apoptótico (Esquema 9).

El aislamiento y re-estimulación de las células T supervivientes a la muerte confirmó que las células T CD4⁺ *lpr* presentaban una clara ventaja proliferativa respecto a las células T control. Ya que en estas condiciones las células T control no se morían por apoptosis, las diferencias proliferativas no podía ser adscritas a una mayor supervivencia de las células T *lpr* (Fig.7B). Esta aproximación experimental nos permitía estudiar de forma específica la capacidad de división y expansión de la población de células T control supervivientes a la apoptosis, confirmando que, *in vitro*, FAS actúa como un regulador negativo del potencial de expansión de esta población celular (Esquema 9). Además, mediante el uso de zVAD, que actúa como un pan-inhibidor de caspasas, lográbamos bloquear la inducción de apoptosis en las células T control tras la activación secundaria (Fig.8A). Bajo estas condiciones, los niveles detectados de muerte fueron similares entre las células T *lpr* y control. Sin embargo, a pesar que los niveles de apoptosis eran iguales, las células deficientes en FAS presentaban una mayor capacidad replicativa que las células control tratadas con zVAD (Fig.8). Este dato confirmaba que la presencia de FAS en las células T, aunque estas sean resistentes a la muerte, inhibe de forma específica la proliferación tras la activación secundaria. Los experimentos de inhibición de muerte con zVAD nos demuestran que: (a) la mayor proliferación de las células T *lpr* no es consecuencia de la falta de muerte, sino un efecto específico de la falta de FAS y (b) que la mayor muerte en las células T control no genera condiciones indirectas, como procesos selectivos de eliminación por apoptosis de las células T con alta capacidad de proliferación, que justifiquen la diferencias proliferativas entre las células T control y deficientes en FAS.

La independencia de la proliferación respecto a la muerte fue confirmada también cuando medíamos la proliferación durante los periodos de expansión con γ IL-2 tras la activación secundaria. En esta etapa del protocolo de estimulación repetida, las células T *lpr* presentan una gran capacidad proliferativa, pero no se detectan diferencias en la inducción de apoptosis comparada con las células control, (Fig.9A, 9B y 9C). Estos resultados sugieren que las células deficientes en FAS mantienen una elevada tasa de replicación en el tiempo, lo que permite extender la respuesta hiperproliferativa más allá de la reacción inmediata a la estimulación a través del TCR.

Los mismos resultados fueron obtenidos cuando aplicábamos la versión abreviada del protocolo de estimulación repetida (de sólo 3 días de duración), confirmando que el fenotipo hiperproliferativo de las células T *lpr* no es consecuencia de la selección de clones de células T *lpr* con alta capacidad replicativa debido al mantenimiento en cultivo durante largos periodos de tiempo. La medidas de longitud telomérica demostraba que no hay diferencias en la longitud de los telómeros entre células T control y *lpr* al término de la segunda estimulación, descartando una posible entrada prematura en senescencia replicativa de las células T control.

Por todo ello, los resultados indicaban que, de forma específica, la señalización mediada por FAS controlaba la capacidad de división de cada célula T individual. Los experimentos de estimulación repetida realizados con las células T procedentes de ratones *gld* y *lpr*^{cg} (con alteraciones funcionales en FAS-L y en el DD de FAS respectivamente), confirmaban que: (a) La inhibición de la replicación celular tras la segunda estimulación esta subordinada a la interacción de FAS con FAS-L. (b) La señal es transmitida al interior de la célula a través del el DD de FAS (Fig.11, Fig.12, Fig.13).



Esquema 9. Representación esquemática del efecto de FAS en el control de la proliferación de las células T estimuladas repetidamente *in vitro*. Tras la activación secundaria FAS ejerce una doble señalización, induciendo la muerte de una parte de la población celular y controlando la capacidad de expansión de las células T resistentes a la apoptosis. En ausencia de FAS las células T activadas manifiestan una proliferación incontrolada.

En conjunto, los resultados obtenidos defienden que la ventaja proliferativa de las células T deficientes en FAS está vinculada a una nueva función de FAS en el control de la proliferación de las células T estimuladas repetidamente. Hemos mostrado que, tras la activación secundaria, la población de células T CD4⁺ obtenida *in vitro* presentan elevados niveles de expresión de CD44 y baja expresión de CD62L (CD4⁺ CD44^{alto}CD62L⁻), tanto en células T control como *lpr* (Fig.5). Este fenotipo particular de células T CD4⁺ se corresponde con el acumulado *in vivo* en el modelo *lpr* (Fig.2C). Además, la acumulación de células T CD4⁺ CD44^{alto}CD62L⁻ es una característica común en diversos modelos de autoinmunidad^{110,112,114,115}, lo que sugiere que el control de la expansión de esta subpoblación de células T activadas es fundamental para la inducción de tolerancia.

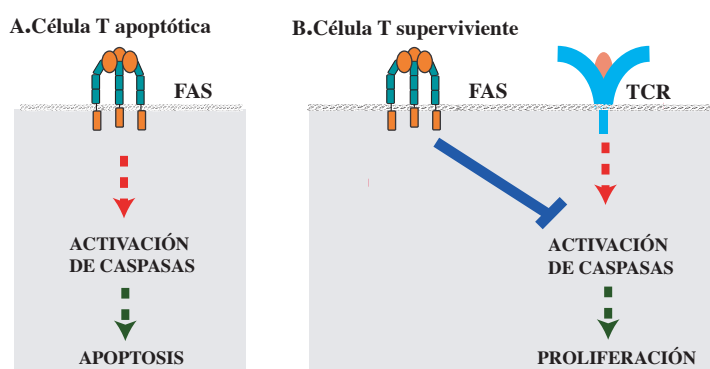
A la vista del paralelismo entre la acumulación de células T CD4⁺CD44^{alto}CD62L⁻ *in vivo* en los ratones *lpr* y el efecto *in vitro* que la falta de FAS tiene sobre la capacidad de división de este subtipo de células T CD4⁺, proponemos que, *in vivo*, el encuentro reiterado y mantenido en el

tiempo de las células T CD4⁺ auto-reactivas con auto-antígenos genera, al igual que ocurre *in vitro*, células T CD4⁺CD44^{alto}CD62L⁻ y que el control de la proliferación de este fenotipo celular mediado por FAS es un requisito esencial para el establecimiento de Tolerancia Periférica frente a antígenos propios.

2. Papel de FAS como regulador negativo de la activación de caspasas dependiente del TCR: consecuencias en la activación de las células T.

En los últimos años se ha puesto en evidencia que las caspasas ejercen un papel dual en la homeostasis de las células T. Además de su papel esencial como mediadores apoptóticos, varios trabajos confirman que, en células T vírgenes, la actividad caspasa es requerida para la activación y proliferación tras la estimulación TCR-dependiente^{86,88-91,143}.

El efecto de zVAD como inhibidor de la inducción de muerte en células T control confirmaba, tal y como era esperable, que la apoptosis observada tras la activación secundaria está subordinada a la activación de caspasas dependiente de FAS (Fig.8A). Cuando tratamos las células T control con dosis más elevadas de zVAD comprobamos que la proliferación de las células T control se veía reducida en presencia del inhibidor de la actividad caspasa (Fig.17D). Estos datos confirmaban que, al igual que ocurre en células T vírgenes, en células T activadas repetidamente la actividad caspasa ejerce un doble papel, por un lado promoviendo muerte por apoptosis inducida por FAS tras la activación y por otro lado fomentando la proliferación de las células T resistentes a la muerte. Además, el comportamiento hiperproliferativo de las células T CD4⁺ *lpr* era también altamente dependiente de la activación de caspasas (Fig.17A , 17B y 17E). Los mismos resultados se obtuvieron analizando el efecto de la inhibición de caspasa en la proliferación de las células T humanas procedentes de pacientes de ALPS (Fig.17F).



Esquema 10. Efecto dual de la actividad caspasa tras la activación secundaria.

Tras la segunda estimulación, tanto FAS como la señalización del TCR conduce a la activación de caspasas. El efecto de la activación de caspasas en cada una de las localizaciones tiene

consecuencias funcionales antagónicas. (A) La activación de caspasas por FAS tienen como consecuencia la inducción de apoptosis en las células T (B) La activación de caspasas mediada por la señalización del TCR favorece la proliferación de las células T supervivientes a la apoptosis. La activación TCR-dependiente de caspasas se ve inhibida por FAS.

Los datos obtenidos con las células T *lpr* y control demostraban que tras la activación secundaria, se produce una activación de caspasas dependiente de la estimulación del TCR (e independiente de FAS) que contribuye positivamente a la proliferación celular. Conjuntamente, los resultados sugieren que tras la estimulación del TCR, FAS puede actuar como un inhibidor de la actividad caspasa necesaria para la proliferación de las células T activadas (Esquema 10). El hecho de que se requieran distintas concentraciones de zVAD para inhibir la apoptosis y la proliferación, indica que los niveles de actividad caspasa necesarios para ambos procesos son distintos.

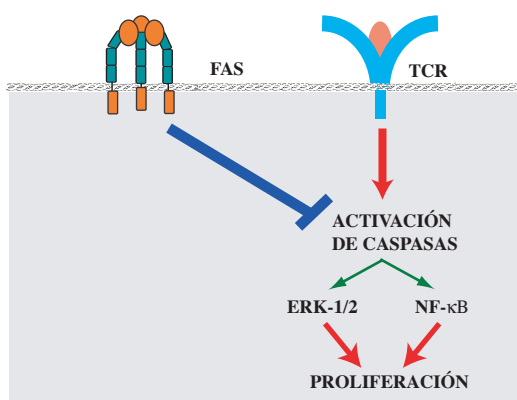
A continuación se discutirá el papel de FAS en la regulación de la activación de caspasas dependiente del TCR y su efecto en el control de la activación celular tras la estimulación antigénica.

2.1 Efecto de FAS en el control de la activación de NF- κ B y ERK-1/2 tras la activación secundaria

La activación del TCR conlleva la activación de múltiples vías de señalización que regulan la proliferación y supervivencia de las células T. NF- κ B es un elemento central para la transducción de la señal de activación, proliferación y supervivencia, regulando la expresión de genes esenciales para la activación linfocitaria (revisado en^{95,104,144}). Hemos comprobado que tras activación repetida, la hiperproliferación de las células T CD4⁺ deficientes en FAS está asociada a una hiperactivación de NF- κ B en comparación a las células T CD4⁺ control (Fig.18A y B). Esta activación es dependiente de la actividad caspasa, ya que su inhibición tiene como consecuencia el bloqueo parcial de la activación de NF- κ B en las células T *lpr* y una menor degradación de I κ B α (Fig.18B y C). La inhibición de la activación de NF- κ B conlleva una fuerte restricción de la capacidad proliferativa de las células T CD4⁺ *lpr* (Fig.17B), lo que sugiere que la hiperproliferación de las células T *lpr* es en gran medida dependiente de la actividad de este factor de transcripción.

Además de la hiperactivación de NF- κ B, hemos mostrado en esta Tesis que tras la activación secundaria, las células T CD4⁺ deficientes en FAS presentan elevados niveles de fosforilación de ERK-1/2 (Fig.21A) y que la inhibición de la activación de esta MAPK, mediante el tratamiento con el inhibidor de la fosforilación de ERK UO 126, restringe drásticamente la capacidad proliferativa de las células T *lpr* (Fig.21B). Análogamente a la activación de NF- κ B, hemos demostrado que la actividad Caspasa es requerida para la activación de ERK-1/2, ya que el uso de inhibidores de actividad caspasa bloquea la fosforilación de la proteína (Fig.21C). Estos datos sugieren que tras una activación secundaria, la activación de ERK-1/2 favorece la proliferación celular. Además esta activación, al igual que en el caso de NF- κ B, es un evento que tiene lugar, en parte, tras la activación de caspasas y que se ve limitado en presencia de FAS.

Los datos confirman que, tras una activación secundaria, FAS limita la proliferación de las células T control, regulando negativamente la activación de NF- κ B y ERK-1/2 dependiente de la activación de caspasas que tiene lugar tras la estimulación del TCR (Esquema 11).



Esquema 11. Efecto de FAS como regulador negativo de la proliferación tras la estimulación secundaria.

Tras la activación secundaria la actividad caspasa inducida por la activación del TCR promueve la activación de NF- κ B y ERK-1/2, lo que favorece la proliferación celular. La señalización mediada por FAS restringe la activación de ambas rutas limitando la activación de caspasas tras la estimulación del TCR, lo que contribuye a controlar la proliferación celular.

2.2 Papel de la Caspasa-8 en la sobre-proliferación de las células T deficientes en FAS

Hasta el momento son pocos los datos acerca de los eventos concretos de señalización que están ligados a la proliferación dependiente de la activación de caspasas. Menos conocidos aún son los mecanismos de regulación que coordinan la acción de las dos funciones antagónicas de las caspasas, activación y muerte. Sin embargo, se ha descrito recientemente que la Caspasa-8, además de su papel en apoptosis, es fundamental para la activación de NF- κ B mediada por el TCR⁹¹⁻⁹⁴. En concordancia, la ausencia *in vivo* de C-8 se asocian con el desarrollo de inmunodeficiencias y defectos proliferativos en células T^{88,89} (ver introducción).

Para comprobar si tras la activación secundaria la C-8 era responsable de la hiperproliferación de las células T CD4⁺ deficientes en FAS, usamos el inhibidor específico de la actividad de la C-8, Z-IETD. El efecto negativo del inhibidor de la C-8 en la proliferación de las células T CD4⁺ *lpr* confirmaba funcionalmente que, al menos, la actividad de la Caspasa-8 está implicada en el fenómeno de sobre-proliferación de las células T deficientes en FAS tras la activación repetida (Fig.18E). Los datos obtenidos recientemente en nuestro laboratorio confirman que, como consecuencia de la estimulación secundaria, se produce una inducción de la actividad C-8 en las células T *lpr* (dato no mostrado).

Tanto el proceso de activación de NF- κ B, como la inducción de la apoptosis, requieren de la actividad enzimática de la C-8. Sin embargo, la forma molecular de la proteína que porta la actividad catalítica requerida en ambos procesos es distinta.

La señalización apoptótica requiere la auto-proteólisis de la procaspasa-8 (p52KDa) tras la formación de DISC^{56,57}. En este contexto, la activación y autoprocésamiento de la C-8 es dependiente de FAS (ver introducción). Por el contrario, la forma molecular de la C-8 con

actividad enzimática que es requerida para la activación de NF- κ B se corresponde con su forma completa no procesada de 52KDa (C8-p52-activa)^{91,93,94} revisado en²⁵. Además, varios trabajos apuntan que, el proceso por el cual la procaspasa-8 pasa de una forma inactiva (C8-p52-inactiva) a una forma activa (C8-p52-activa), no requiere la señalización por FAS^{93,94,146}.

Según los resultados publicados⁹¹⁻⁹³, tras la activación del TCR, la PKC θ es reclutada a las balsas lipídicas (en inglés, *lipids rafts*) en la zona de la sinapsis inmunológica. En este microambiente la PKC θ se une y fosforila a CARMA-1. Tras la fosforilación, CARMA-1, adquiere una forma conformacional abierta que permite el reclutamiento secuencial a los *lipids rafts* de BCL10, MALT-1, C-8 (p52-inactiva) y FADD. Por un proceso aún no conocido, en este contexto, la forma no procesada de la C-8 se activa adquiriendo actividad enzimática (p52-activa). La C-8 activada favorece el reclutamiento de TRAF6 y el complejo IKK, al complejo formado por CARMA-1, BCL-10 y MALT-1. La correcta formación de este macro-complejo permite la activación del complejo IKK, la fosforilación de I κ B α y la traslocación al núcleo de NF- κ B (Esquema 5, apartado de Introducción).

Hemos comprobado que, tras la activación secundaria, las células T CD4⁺ *lpr* expresaban únicamente la forma no procesada de 52KDa de la C-8 (Fig.20A), indicando que la activación de la C-8 necesaria para la proliferación de las células T deficientes en FAS no implica su autoprosesamiento tras la activación del TCR, en concordancia con el modelo de activación de NF- κ B dependiente de C-8 descrito en la literatura.

2.3 Modelo teórico de regulación negativa de la activación por FAS

Los datos descritos confirman que la hiperproliferación de las células T *lpr* está subordinada a la activación de NF- κ B y ERK-1/2. Además hemos demostrado que, tanto la activación de ambas rutas, como la proliferación, es dependiente de la actividad caspasa tras la estimulación secundaria. Sabemos además que, dentro del conjunto de posibles caspasas efectoras, al menos la actividad de la C-8 ejerce un papel clave como mediadora de la sobre-proliferación de las células T deficientes en FAS. En las células T *lpr* no ha sido detectado autoprosesamiento de la C-8 tras la activación secundaria, lo que indica que la forma molecularmente activa de la C-8 se corresponde con la forma no truncada de 52KDa (p52-activa). Sin embargo, la expresión de C-8 no es inducida tras la activación secundaria, ni se detectan diferencias de expresión entre las células T CD4⁺ control y *lpr*. Esto nos lleva a pensar que el mecanismo de regulación de la activación y proliferación mediado por FAS implica el control de la transición de la forma inactiva de la C-8 (p52-inactiva) hacia la forma activa no procesada de la C-8 (p52-activa)

Basándonos en el papel de la C-8 en la activación de NF- κ B, en esta Tesis proponemos que la señalización por FAS limita la capacidad de activación de la forma no procesada de la C-8 (p52-inactiva) tras la estimulación repetida del TCR, lo que conlleva una menor actividad transcripcional de NF- κ B y consecuente restricción de la capacidad proliferativa de las células T.

Dos preguntas fundamentales que emergen tras este planteamiento son:

- a- ¿Cómo se activa la C-8 durante el proceso de proliferación y activación TCR-dependiente?
- b- ¿Cómo FAS actúa sobre este fenómeno para limitar la activación de la C-8?

Aunque no tenemos datos suficientes para plantear un modelo formal que defina expresamente el modo por el cual FAS controla la activación tras la estimulación repetida, basándonos en datos bibliográficos y en nuestros propios resultados, podemos aproximar un posible modelo hipotético que explique el efecto negativo de FAS sobre la activación de NF- κ B y ERK-1/2 dependiente de la forma activa no procesada de la C-8.

2.3.1 Modelo de activación de la procaspasa-8 tras la estimulación secundaria en células T

Un candidato potencial para mediar el proceso de activación de la C-8, tras la activación del TCR, es c-FLIP_L. Se ha descrito que c-FLIP_L puede actuar como un sustrato activador de la C-8^{63,94,146-148}. c-FLIP_L presenta la capacidad de formar un heterodímero con la procaspasa-8 (p52-inactiva), estabilizado por las interacciones *Caspase-Domain/Caspase-Like-Domain* presentes en C-8 y c-FLIP_L respectivamente. La región C terminal de c-FLIP_L contiene un bucle de activación que solapa y expone el centro catalítico de la C-8, activando parcialmente la proenzima. Bajo estas condiciones, la actividad proteasa de la C-8 activada (p52-activa) es suficiente para provocar la escisión de c-FLIP_L en un fragmento N-terminal de 43kDa (p43c-FLIP_L) y un fragmento C-terminal de 12kDa (p12c-FLIP_L). A pesar de la homología estructural entre ambas moléculas, c-FLIP_L carece de actividad enzimática. Por tanto, en el contexto del heterodímero c-FLIP_L/C-8, no tiene lugar el procesamiento recíproco de la C-8. La formación del heterodímero c-FLIP_L/C-8, la consecuente activación de la C-8 y el procesamiento de c-FLIP_L es independiente de FAS^{93,94}.

Las células T procedentes de ratones transgénicos para c-FLIP_L (c-FLIP_L-Tg) manifiestan un fenotipo hiperproliferativo *in vitro* tras la activación del TCR^{94,167}. Coincidiendo con lo descrito en esta Tesis para las células T *lpr*, la sobre-proliferación de las células T c-FLIP_L-Tg está vinculada a la hiperactivación de NF- κ B dependiente de la activación de caspasas^{94,150}. En concordancia con el papel descrito para la C-8 en la activación de NF- κ B, la forma de la C-8 con actividad proteasa detectable en las células T c-FLIP_L-Tg se corresponde con la forma no procesada de 52Kda (p52-activa)⁹⁴. En base a los resultados descritos para c-FLIP_L como sustrato activador de la C-8 y en función de los datos obtenidos con las células T c-FLIP_L-tg, se ha propuesto que la sobre-expresión de c-FLIP_L en los ratones c-FLIP_L-tg, provoca, tras la activación del TCR, una sobre-activación de la forma no procesada de la C-8, lo que redundará en la mayor activación de NF- κ B, generando un fenotipo hiperproliferativo en las células T⁹⁴.

Más allá de activar a la C-8, se ha descrito que c-FLIP_L ejerce un papel específico, tanto en la ruta de amplificación de la propia señal de activación de NF- κ B, como en activación de ERK-1/2^{150,159}. Se ha comprobado que tras la activación de la C-8 y la consecuente escisión de

c-FLIP_L, p43c-FLIP_L puede asociarse con TRAF1, TRAF2 y RIP1 para promover la activación de NF-κB^{93,94,149}. Además, en células T, la forma procesada de c-FLIP_L (p43c-FLIP_L) puede asociarse a RAF1 favoreciendo su activación tras la estimulación del TCR, lo que permite la fosforilación y activación de ERK-1/2, a través de MEK1 y MEK2, de forma RAS independiente¹⁵⁰.

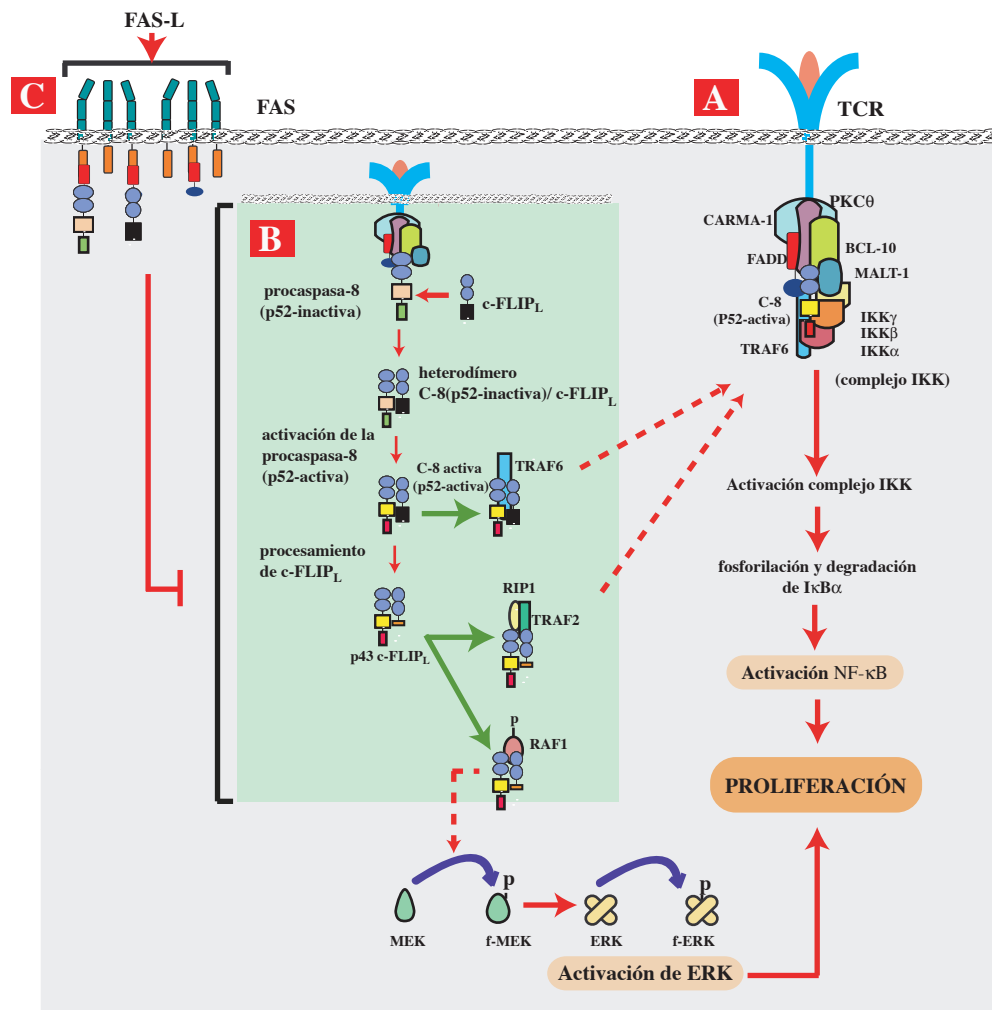
Hemos detectado, tras la activación secundaria, mayor expresión de c-FLIP_L y su forma procesada correspondiente p43c-FLIP_L en las T CD4⁺ *lpr*, comparado con las células T control resistentes a apoptosis (Fig.20B). Los resultados descritos en la literatura acerca del papel de c-FLIP_L en la activación de la C-8, NF-κB y ERK-1/2 y el paralelismo entre los resultados obtenidos con las células T *lpr* y c-FLIP_L-Tg, sugieren que la mayor expresión de esta molécula detectada en las células T *lpr* puede tener un papel esencial en la hiperproliferación de las células T deficientes en FAS.

Observamos también que los niveles de expresión de FADD eran mayores en las células T CD4⁺ *lpr* tras la activación secundaria (Fig.20B). Los trabajos descritos en la bibliografía confirman que FADD es fundamental para la correcta activación y proliferación de las células T primarias (ver introducción), sin embargo, los datos acerca del mecanismo de acción molecular de FADD son muy limitados. Su presencia en el complejo de activación dependiente de la activación de PKCθ⁹¹ sugieren que puede actuar como una proteína adaptadora que facilite la interacción de C-8 o c-FLIP_L con sus sustratos específicos.

En base a los resultados descritos podemos sugerir que, en células T sometidas a activación repetida, el reclutamiento de c-FLIP_L al complejo de activación del entorno del TCR favorece la propia activación de la C-8, potenciando la activación de NF-κB tras la formación de un heterodímero C-8/ cFLIP_L (Esquema 12 A). Además, la activación de la C-8 provocaría la escisión de c-FLIP_L para dar lugar a p43c-FLIP_L (Esquema 12 B). p43c-FLIP_L a su vez podría reclutar TRAF1, TRAF2 y RIP1 al multiagregado proteico, reforzando la activación del complejo IKK, la fosforilación y degradación de IκBα y la consecuente traslocación al núcleo de NF-κB (Esquema 12 C). Por otra parte, los elevados niveles de p43c-FLIP_L favorecerían la activación de ERK-1/2 de forma RAF1 dependiente (Esquema 12 D).

Se ha descrito que la expresión de c-FLIP_L se induce como consecuencia de la propia actividad transcripcional de NF-κB^{168,169}, por lo que este mecanismo de activación mediado por c-FLIP_L podría representar un mecanismo de retroalimentación positiva que permitiría que, tras la activación secundaria, las células T alcancen los niveles necesarios de activación de NF-κB^{168,169} y ERK necesarios por la activación y proliferación celular.

Los resultados obtenidos sugieren que, en células T control, FAS actúa como un regulador negativo de la ruta de activación mediada por la activación de la C-8, restringiendo la activación de la forma no procesada de la C-8 y los niveles de p43c-FLIP_L, lo que tiene como consecuencia la limitación en la activación de ERK1-2 y NF-κB y la menor proliferación de las células T tras la estimulación repetida (Esquema 12).



Esquema 12. Modelo teórico de regulación de la activación de la procaspasa-8 dependiente del TCR tras la estimulación secundaria de las células T, consecuencias moleculares sobre la activación de NF-κB y ERK-1/2. (A)

La activación del TCR tras la estimulación secundaria conduce a la activación de PKCθ, lo que permite el reclutamiento secuencial de CARMA-1, BCL-10, MALT-1, FADD y C-8 al entorno de señalización del TCR. En este contexto tiene lugar la activación de la forma no procesada de la C-8 (transición p52-inactiva a p52-activa). La actividad enzimática de la C-8 permite el reclutamiento del complejo IKK y TRAF6 al complejo de señalización. Una vez en el entorno de señalización, el complejo IKK se activa. Tras la activación, se induce la fosforilación de IκBα, lo que permite la liberación y translocación al núcleo de NF-κB. **(B)** El reclutamiento adicional de c-FLIP_L al macrocomplejo de señalización tiene como consecuencia la formación de un heterodímero C-8/c-FLIP_L. La heterodimerización provoca la activación parcial de la C-8 (pero no su auto-procesamiento) y la consecuente escisión de c-FLIP_L en un fragmento N-terminal de 43kDa (p43c-FLIP_L) y un fragmento C-terminal de 12kDa (p12c-FLIP_L). La C-8 activada por c-FLIP_L consolida el reclutamiento de TRAF6 y el complejo IKK al complejo de señalización, reforzando la activación de NF-κB. A su vez, p43c-FLIP_L se une a TRAF2 y RIP1 que favorece la activación del complejo IKK y la activación de NF-κB. Además, p43c-FLIP_L se une a RAF1 para promover la activación de ERK-1/2. Las convergencia de las distintas rutas de activación de NF-κB y ERK-1/2 permite alcanzar a la célula T los niveles de activación requeridos para la proliferación tras la estimulación secundaria. **(C)** En células T supervivientes a la apoptosis FAS compite con el entorno del TCR por el reclutamiento de FADD, C-8 y c-FLIP_L, impidiendo la interacción de estas moléculas con los sustratos implicados en las vías de activación de NF-κB y ERK-1/2, regulando negativamente la proliferación tras la estimulación secundaria.

La señalización apoptótica mediada por FAS es un proceso secuencial que requiere múltiples pasos más allá del reclutamiento de la FADD y C-8 al DD de FAS (ver introducción). Los resultados obtenidos nos llevan a proponer que, en las células T control que sobreviven a la apoptosis (debido a defectos en oligomerización, internalización, bajos niveles locales de C-8..etc), la señalización por FAS, aunque no es suficiente como para inducir apoptosis, compete con el TCR por el reclutamiento de C-8, FADD y especialmente de c-FLIP_L, restringiendo la interacción de estas moléculas con los sustratos implicados en la vía de activación de NF-κB (BCL10, MALT1, complejo IKK., TRAF6, TRAF2...etc).

En base a este modelo, en las células T *lpr*, la ausencia de FAS permitiría una mayor activación inicial de ERK1-/2 y NF-κB tras el reclutamiento de la C-8 al entorno del TCR. La mayor actividad transcripcional de NF-κB favorecería la propia síntesis de c-FLIP_L, el cual reforzaría la activación de la C-8, NF-κB y ERK-1/2, alcanzándose tras la activación secundaria altos niveles de activación y proliferación celular.

2.4 Efecto de la señalización por FAS en el control de la regulación del ciclo celular: papel de p21 en el control de la proliferación de las células T *lpr*

La proliferación celular depende de la correcta transición a través de las diferentes fases del ciclo celular (ver introducción). La activación de la quinasa dependiente de ciclina CDK2 es fundamental para la irreversibilidad y correcta transición entre la fase G₁/S, de ahí que la actividad quinasa CDK2 se utilice como un indicador molecular de proliferación activa¹⁷⁰. Tal y como era de esperar, la ventaja proliferativa de las células T *lpr* se asocia con una mayor actividad CDK2 *in vitro* (Fig.22A y 24D). Las diferencias en la actividad quinasa de la CDK2 entre células T control y *lpr* son evidentes desde las primeras fases de la estimulación secundaria, en concordancia con los datos de proliferación e hiperactivación de NF-κB y ERK-1/2. Sin embargo, coincidiendo con el pico de proliferación, las células T *lpr* alcanzan un máximo de actividad CDK2 a las 72 h de la estimulación secundaria (Fig.22A). Los dos principales reguladores directos de la actividad CDK2 son los inhibidores de ciclo celular de la familia Cip/Kip, p21 y p27^{105,160,162,170}. Coincidiendo con el máximo de actividad CDK2 detectamos un significativo descenso en los niveles de expresión de p21 y un antagónico aumento en la expresión de p27 (Fig.22C).

Estos resultados sugieren que, a pesar de los elevados niveles de expresión de p27, en condiciones de activación reiterada la disminución de expresión de p21 puede ser un requisito para alcanzar los altos niveles de proliferación registrados en las células T *lpr* en los últimos estadios de la activación secundaria. Esta hipótesis está en consonancia con los resultados obtenidos en nuestro laboratorio confirmando que p21 es un elemento fundamental en el control de la respuesta proliferativa de las células T que tras activación repetida sobreviven a la inducción de apoptosis (¹¹⁰ y Fig.23).

Los experimentos *in vitro* con las células T procedentes de ratones *lpr/p21^{-/-}* y ratones *lpr-p21tg* confirman que los niveles de expresión de p21 son determinantes para definir el grado de proliferación de las células T *lpr*, ya que, reduciendo o aumentando respectivamente la expresión de p21, incrementamos o disminuimos la proliferación de las células T deficientes en FAS tras la segunda estimulación (Fig.23 y Fig.24 respectivamente). Además, el análisis *in vivo* de las características proliferativas de las células T de los ratones *lpr-p21tg* ratifican que la sobre-expresión del inhibidor de ciclo celular limita la proliferación de las células T *lpr* en un contexto fisiológico, extendiendo a un contexto homeostático la relevancia de los datos obtenidos *in vitro* (Fig.27).

Hemos descrito anteriormente que la hiperproliferación de las células T *lpr* puede ser inhibida mediante el empleo de inhibidores de la actividad caspasa. Cuando estudiamos el efecto de estos inhibidores sobre los niveles de expresión de p21, descubrimos que el bloqueo de la actividad caspasa impedía el descenso de la expresión de p21 detectado en las células T *lpr* en las últimas etapas de la activación secundaria, sugiriendo una relación directa entre actividad caspasa y la regulación del ciclo celular en células T activadas (Fig.26). Varios trabajos avalan esta relación. Así, entre los sustratos específicos de las caspasas se encuentran varias componentes de la maquinaria de regulación del ciclo celular como Wee1^{87,171}, CDC2¹⁷¹, CDC27¹⁷¹, o el propio p21^{162,163}. Más concretamente, se ha demostrado que p21 presenta un sitio de unión con la Caspasa-3¹⁰⁸ (abreviado, C-3) y que tras activación de la misma, p21 puede actuar como sustrato específico de la C-3¹⁶¹.

Los resultados obtenidos nos llevan a proponer que la hiperproliferación de las células T *lpr* es resultado de la yuxtaposición de varios eventos que en conjunto contribuye a mantener un estado de hiperrespuesta en ausencia de FAS. Así, tras la activación secundaria, la ausencia de inhibición de la actividad caspasa en las células T *lpr* es responsable de la hiperactivación de NF-κB y ERK-1/2, lo que favorece la actividad CDK2 y la proliferación celular. Por otro lado, en los últimos estadios de la proliferación secundaria, de una forma que aún no hemos definido, la actividad caspasa mantenida en el tiempo favorece la regulación negativa de p21, lo que incrementa la actividad CDK2 y en consecuencia refuerza el carácter sobre-proliferativo de las células T *lpr*, prolongando el fenotipo replicativo en el tiempo. Podría proponerse que la activación sostenida de la C-8 pudiera inducir la activación de C-3, la cual degradaría p21 favoreciendo la proliferación. Otra alternativa reside en que la propia hiperactivación de ERK y/o NF-κB tenga como consecuencia un efecto negativo sobre la expresión de p21, que justifique el descenso de expresión detectado a las 72 h de la estimulación secundaria.

3. Papel de FAS en la regulación de la respuesta de las células T ante antígenos endógenos: implicaciones para el desarrollo de autoinmunidad

El defecto en la expresión de FAS está vinculado al desarrollo de un fenotipo autoinmune, indicando que *in vivo*, FAS ejerce una función esencial para la homeostasis inmunológica, especialmente en la inducción de Tolerancia Periférica. Basándose en la actividad pro-apoptótica

de FAS *in vitro*, se ha postulado que el origen de la pérdida de tolerancia asociada a la falta de FAS, radica en una falta de muerte de las células T auto-reactivas tras estimulación continuada. Por definición, el origen de los procesos autoinmunes se localiza en la respuesta del Sistema Inmunológico contra antígenos endógenos. A lo largo de los años se han diseñado diversas aproximaciones experimentales para estudiar la respuesta *in vivo* de las células T deficientes en FAS, tanto frente a antígenos exógenos como frente a antígenos propios. A pesar del claro efecto de FAS como inductor de apoptosis *in vitro*, la relevancia funcional de FAS como inductor de apoptosis *in vivo* y su papel en la homeostasis del Sistema Inmunológico continúa sin aclararse íntegramente, ya que el comportamiento de las células T *lpr* en los modelos de inmunización no se ajusta a lo esperado en condiciones de falta de muerte y la demostración formal del papel apoptótico de FAS *in vivo*, no ha sido establecida de forma definitiva, quedando restringida a condiciones muy específicas de inmunización (revisado en⁹).

Varios estudios confirman que no hay defectos ni en la expansión, ni en la contracción de la respuesta de las células T *lpr* frente a antígenos administrados como péptidos exógenos (presentados con co-estimulación) o ante infecciones virales^{34-36,183,184}, indicando que FAS no media una función específica en la respuesta inmunológica contra antígenos externos.

Cuando los modelos de inmunización pretenden mimetizar la respuesta frente a antígenos endógenos, los resultados obtenidos varían en función de la naturaleza del modelo experimental. Se ha demostrado que tras la administración de superantígenos^{38,39} o la inyección del péptido específico en ratones con células T CD4⁺ con TCR transgénico^{30,31}, la eliminación de células T específicas requiere la expresión de FAS. Sin embargo, aunque el fenómeno apoptótico se ha podido constatar bajo estas condiciones, en ambos modelos tiene lugar una respuesta masiva y sincrónica de células T en una misma localización anatómica, lo que ha llevado a cuestionar la relevancia funcional real de estos experimentos¹⁶.

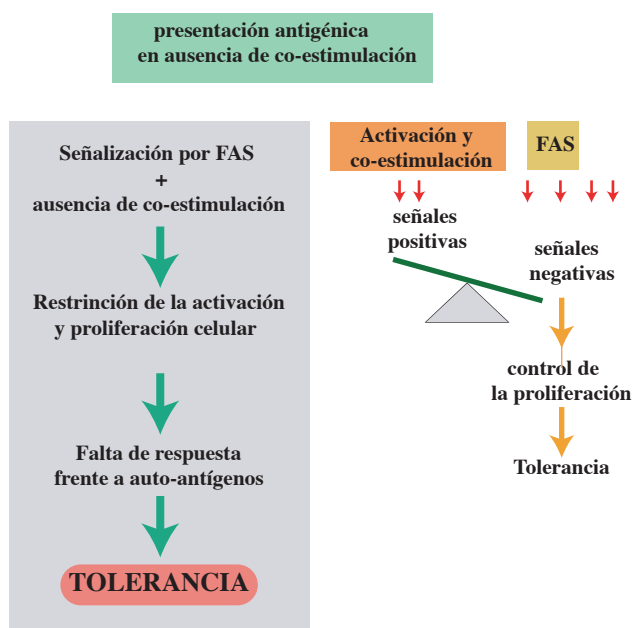
Para estudiar el efecto de FAS en una respuesta frente a antígenos propios en condiciones más cercanas a la situación fisiológica, se han desarrollado modelos experimentales de transferencia adoptiva de células T CD4⁺ TCR transgénicas específicas para un péptido derivado de la lisozima del huevo de gallina (en inglés abreviado, HEL), en ratones recipiente que expresan constitutivamente el péptido en el suero³⁶. De esta forma, tras la transferencia, el 0,4-0,5% de las células T de los órganos linfoides secundarios de los ratones recipiente son específicas para el péptido. Ya que los ratones recipiente expresan el péptido específico de forma constitutiva, en estos ratones el antígeno es presentado a las células T como un auto-antígeno (sin co-estimulación). El análisis detallado de los datos publicados revelan que, 3 días después de la transferencia, no se detecta delección celular que indique inducción de apoptosis en el caso de las células T control, ya que el número de células transgénicas detectadas, lejos de disminuir como se esperaría tras la inducción de apoptosis, aumenta hasta triplicar el número inicial. Sin embargo, análogamente a lo que nosotros hemos descrito *in vitro*, las células deficientes en FAS manifiestan una clara ventaja proliferativa frente a las células T control. En relación con estos resultados, en la literatura podemos encontrar varias referencias que sugieren que, bajo condiciones fisiológicas, la deficiencia en FAS se asocia con un fenotipo hiperproliferativo de las células T¹¹⁷⁻¹²⁰.

En base al papel de FAS como inductor de apoptosis *in vitro* y dado que en el momento de realización de los trabajos no se habían descrito anomalías proliferativas en las células T debido a la falta de FAS, las diferencias en la dinámica de respuesta, entre células T control y *lpr*, fueron interpretadas como consecuencia indirecta de la falta de muerte en las células deficientes en FAS.

Los resultados descritos indican que el papel fisiológico, de cualesquiera de las funciones que ejerce FAS, está restringido a respuestas frente a antígenos endógenos presentados en ausencia de co-estimulación. Los datos publicados sugieren que la función apoptótica de FAS y su función como regulador negativo de la proliferación requieren distintos umbrales de activación. Según los resultados obtenidos con los modelos de inmunización *in vivo*, la inducción de apoptosis está subordinada a la presencia de un gran número de células T activadas sincrónicamente. Sin embargo, cuando el número de células T específicas para un péptido, presentado en ausencia de co-estimulación, suponen un porcentaje reducido respecto al total, los resultados sugieren que FAS actúa como un regulador negativo de la proliferación celular.

En base a los datos descritos proponemos que el grado de activación y proliferación de una célula T activada repetidamente está directamente relacionado con el resultado del balance entre las señales de activación positivas, mediadas por la co-estimulación, y las señales negativas derivadas de FAS descritas en esta Tesis, entre otras. De esta forma, cuanta mayor señalización por FAS reciban las células T, mayores niveles de co-estimulación requerirán para poder activarse y proliferar (Esquema 13). En base a este modelo, proponemos que en un contexto fisiológico, los niveles de activación proporcionadas por un auto-antígeno presentado en ausencia de co-estimulación no son suficientes como para compensar el efecto negativo de la señalización por FAS, lo que conduce al fracaso en la activación de la célula T auto-reactiva (Esquema 13).

De acuerdo con esta propuesta, en el modelo de regulación de la proliferación mediado por FAS propuesto en esta Tesis (Esquema 12), la co-estimulación puede jugar un papel crucial. Así, por ejemplo, la señalización mediada por CD28 inhibe la síntesis de FAS-L inducida tras la activación del TCR^{172,173} e incrementa la traslocación a la membrana, el reclutamiento a los *lipids rafts* y la actividad enzimática de la propia PKC θ mediado por la activación de la fosfatidilinositol-3-quinasa (en inglés abreviado, *PI3K*)¹⁷⁴⁻¹⁷⁶(revisado en^{96,177}). Ambos eventos tendrían, un efecto positivo para la activación de la forma p-52 de la C-8 dependiente del TCR, lo que redundaría en una mayor activación de NF- κ B y ERK-1/2. Se ha descrito también que el fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (abreviado PIP3), generado por la PI3K, puede activar a la AKT/proteína quinasa B (en inglés abreviado, PKB). Por su parte, la PKB activada regula positivamente la expresión de c-FLIP¹⁷⁸⁻¹⁸⁰. De acuerdo con lo descrito, la inhibición de la actividad de la PI3K y aminora considerablemente el desarrollo de glomerulonefritis en los ratones MRL-*lpr*^{181,182}.



Esquema 13. Modelización del resultado del balance entre señales positivas y negativas derivadas del reconocimiento repetido de un antígeno en ausencia de co-estimulación.

La señalización mediada por el TCR promueve la activación de la procaspasa-8, lo que favorece la proliferación celular. Esta vía de activación se ve influida negativamente por la señalización de FAS. La activación reiterada de una célula T por antígenos propios tiene como consecuencia el aumento de la expresión de FAS y FAS-L. Tras la activación antigénica, la señalización mediada por la interacción FAS/FAS-L regula negativamente la activación y

proliferación celular, lo que contribuye a abortar la respuesta efectora frente a antígenos endógenos. El resultado del balance entre la intensidad de las señales negativas y las señales positivas, complementaria a la activación del TCR, marcarán el grado de respuesta de las células T tras la estimulación antigénica en un contexto fisiológico.

Nuestros resultados *in vitro* demuestran, por primera vez, que la señalización mediada por FAS desempeña un papel dual en la regulación de la respuesta de las células T activadas. Además de inducir la muerte por apoptosis de las células T estimuladas repetidamente, FAS controla la activación y proliferación de las células T supervivientes a la muerte. Mediante los experimentos de incorporación de BrdU, hemos comprobado que la falta de FAS favorece la proliferación *in vivo* de las células T, demostrando que en ausencia de FAS el fenómeno de proliferación activa es una realidad fisiológica (Fig.10). Ya que los animales se crían en un ambiente libre de patógenos, es de suponer que la respuesta proliferativa observada en los ratones *lpr* responde a la activación frente a auto-antígenos. En este sentido, los experimentos comentados de transferencia adoptiva confirman que, *in vivo*, FAS controla la respuesta proliferativa de las células T frente a antígenos endógenos.

Diferentes trabajos confirman que el control de la proliferación de las células T es esencial para el establecimiento de Tolerancia Periférica. Se ha podido comprobar que defectos en la expresión de reguladores del ciclo celular en modelos animales favorece la sobre-proliferación de las células T, lo que contribuyen drásticamente al desarrollo de fenotipos autoinmunes de características similares al observado en ausencia de FAS^{109-112,114,115} (ver introducción).

Como hemos comentado anteriormente en esta Tesis, la ausencia de muerte no explica en su totalidad el fenotipo del modelo *lpr*. Ya que las anomalías apoptóticas no explican en su totalidad el fenotipo autoinmune de los ratones *lpr* y dado que el papel *in vivo* de FAS como mediador de muerte no se ha podido demostrar formalmente, hemos planteado la hipótesis de que la nueva función propuesta en esta Tesis para FAS, como regulador de la activación y proliferación

de las células T, contribuye de forma esencial al establecimiento de Tolerancia Periférica. Bajo esta asunción proponemos que en los ratones deficientes en FAS, el desarrollo de la patología autoinmune se debe, en gran medida, a una mayor capacidad de respuesta proliferativa de sus células T y no tanto a una deficiencia en la inducción de muerte. Hipotetizamos que el ciclo celular y la apoptosis están intrínsecamente relacionados en la coordinación del proceso de activación, proliferación y control de la homeostasis celular tras el encuentro de la célula T con el antígeno. Concretamente, proponemos que FAS ejerce un papel esencial en la inducción de Tolerancia Periférica limitando la activación y proliferación de las células T activadas tras el reconocimiento de antígenos presentados en ausencia de co-estimulación.

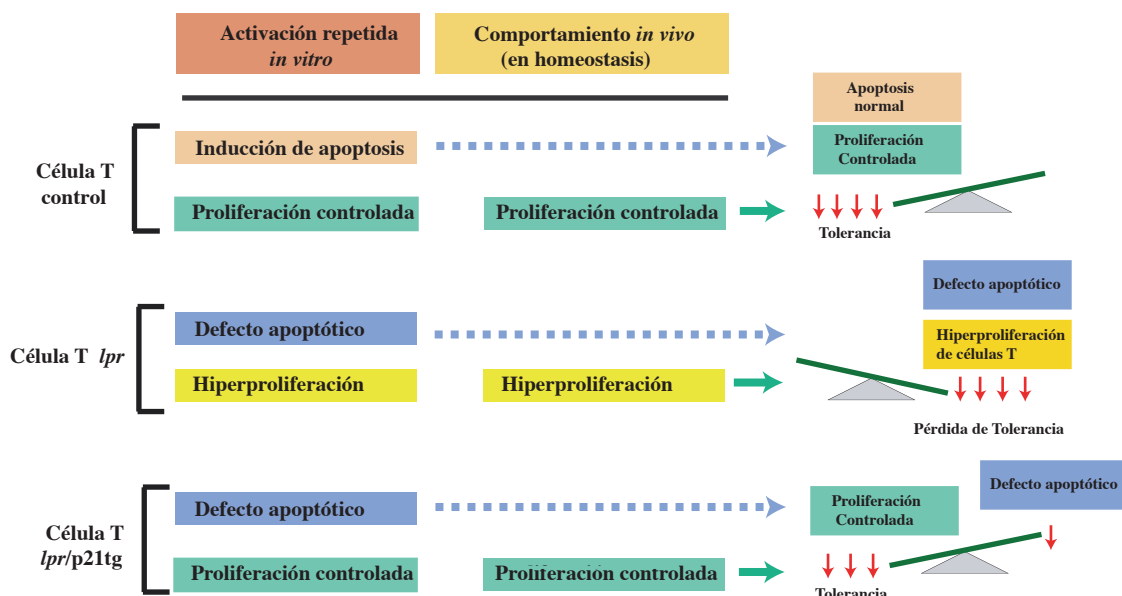
3.1 El control de la proliferación de las células T *lpr* *in vivo* es un factor fundamental en el establecimiento de Tolerancia Periférica.

Según nuestra hipótesis, la reducción de la respuesta replicativa *in vivo* de las células T *lpr* permitiría, aún a pesar de los defectos apoptóticos, aminorar la severidad de la enfermedad. Para confirmar esta teoría analizamos las características patológicas de los ratones *lpr*-p21tg. En estos animales, la expresión de p21 está controlada por el promotor de *lck*, quedando por tanto restringida al linaje T¹²¹. Hemos demostrado anteriormente que la sobre-expresión del inhibidor de ciclo celular en las células T *lpr* restringía la replicación celular, sin afectar a la resistencia a la inducción apoptótica, característica de la falta de FAS (Fig.24). El análisis *in vivo* de las características proliferativas de las células T de los ratones *lpr*-p21tg confirman que la inhibición de la proliferación a consecuencia de la expresión de p21 es un fenómeno constatable en un contexto fisiológico (Fig.27). De esta forma, los ratones *lpr*-p21tg se constituían una herramienta fundamental para estudiar la contribución de la sobre-proliferación de las células T *lpr* al desarrollo de una patología autoinmune.

Cuando analizamos los rasgos autoinmunes asociados al fenotipo de los ratones *lpr*-p21tg, encontramos que, a pesar de que las células *lpr*-p21tg presentan los mismos defectos apoptóticos que las células T *lpr* (Fig.24E), los ratones transgénicos presentaban una clara disminución en la severidad de la enfermedad. Estudiamos los principales parámetros diagnósticos característicos del fenotipo *lpr*: hiperplasia de los ganglios linfáticos (Fig.28), acumulación de células T Doble Negativas (Fig.29A, 29B y 29C), acumulación de células T CD4⁺ de memoria (Fig.29D, 29E), hiperactivación de células B (Fig.30), presencia de auto-anticuerpos en suero (Fig.31A), infiltrados renales de células inflamatorias (Fig.31B), y grado de afectación glomerular (Fig.31C). En todos los casos las alteraciones asociadas a la falta de FAS se veían reducidas debido a la sobre-expresión de p21 en las células T.

Los datos demuestran que, aún siendo refractarias a la muerte por apoptosis, limitando la hiperproliferación de las células T *lpr* podemos controlar el desarrollo de la patología autoinmune. Los resultados obtenidos confirman que el papel de FAS como regulador negativo

de la proliferación de las células T propuesto en esta Tesis contribuye de forma fundamental a la homeostasis del Sistema Inmunológico y al establecimiento de Tolerancia Periférica en un contexto fisiológico real (Esquema 14).



Esquema 14. El control de la proliferación de las células T *in vivo* mediado por FAS es fundamental para la homeostasis y el establecimiento de Tolerancia Periférica. Izquierda, esquema resumen de los resultados obtenidos al testar las características de respuesta de las células T control, *lpr* y *lpr-p21tg* *in vivo* e *in vitro*. Derecha, el control de la proliferación de las células T *lpr* mediante la sobre-expresión de p21 permite limitar el desarrollo de la patología autoinmune aún a pesar de la resistencia a la inducción de apoptosis.

4. Nuevo punto de vista para el diseño de aplicaciones terapéuticas en pacientes con defectos en la expresión de FAS: implicación de la falta de FAS en el desarrollo de linfomas

Hemos mostrado que, al igual que en el caso de las células T *lpr*, en células T procedentes de pacientes de ALPS tipo Ia los defectos en la señalización por FAS se asocian con una mayor respuesta proliferativa *in vitro* (Fig.15). Los análisis anatómo-patológicos de los ganglios linfáticos de estos pacientes demuestran que la hiperproliferación es fenómeno claramente observable *in vivo*^{119,120}. Hemos demostrado que el control de la sobre-proliferación de las células T deficientes en FAS contribuye a rebajar la severidad de la enfermedad autoinmune en los ratones *lpr*, aún cuando la resistencia a la muerte no se ve alterada. En esta Tesis establecemos un nuevo enfoque a la hora de entender el fenotipo asociado al defecto en la expresión de FAS. Según nuestro punto de vista, la terapéutica a seguir en pacientes de ALPS debe estar enfocada, no tanto a restablecer la sensibilidad a apoptosis, sino a limitar la capacidad proliferativa de las células T.

Más allá de la patología autoinmune, uno de los problemas más importantes ligados a la falta de FAS en los pacientes de ALPS es su alta susceptibilidad al desarrollo de linfomas⁶⁸.

Además, numerosas referencias bibliográficas confirman que defectos en la funcionalidad de FAS se asocian con el desarrollo de procesos neoplásicos en niños y adultos¹⁸⁵⁻¹⁹⁰. Clásicamente se ha relacionado el potencial tumoral de las células defectivas e FAS con la resistencia a inducción de apoptosis¹⁹¹. En esta Tesis demostramos que además de no morir, las células deficientes en FAS presentan unas características bioquímicas, hiperactivación de NF- κ B, aumento de la actividad telomerasa, mayor expresión de FLIP y menor expresión de p21 que, más allá de la muerte, pueden contribuir en gran medida a la malignidad tumoral, tal y como sugieren los datos bibliográficos en cuanto al papel de estas moléculas en los procesos de desarrollo tumoral^{95,141,142,192-194}.

En base a nuestros resultados, la activación de caspasas contribuye en gran medida al fenotipo hiperproliferativo de las células T de los pacientes de ALPS tipo Ia tras la activación del TCR (Fig.17F y Fig.19D). Proponemos que la caracterización bioquímica de la ruta de activación de caspasas dependiente de la estimulación del TCR y su mecanismo de acción en los fenómenos de activación celular, es una fuente potencial de información, que puede facilitar el diseño de nuevos abordajes terapéuticos con aplicaciones en el tratamiento de procesos auto-inmunes y linfomagénicos basados en la inhibición selectiva de la actividad caspasa.

5. Conclusión final

Tras la exposición a un antígeno, los linocitos T deben activarse, proliferar y desarrollar respuestas efectoras con el objetivo final de organizar una respuesta inmune productiva que tenga como consecuencia la eliminación del agente agresor. Sin embargo, la activación linfocitaria ha de estar limitada a antígenos exógenos. Constantemente se generan linfocitos cuyos receptores de antígeno son capaces de reconocer antígenos propios. La homeostasis del Sistema Inmunológico requiere que esos linfocitos con especificidades frente a péptidos endógenos no se activen, o en caso de hacerlo, se aborte el proceso de activación, de modo que no tengan lugar la secuencia efectora asociada a la activación antigénica.

Una diferencia fundamental en la biología de los antígenos propios frente a los procedentes del exterior es que, estos últimos, desencadenan la activación del Sistema Inmunológico Innato. Como consecuencia, durante la presentación antigénica, las células dendríticas (células especializadas en la presentación de antígenos a las células T) proveen a la célula T de señales complementarias al TCR que modulan la activación celular. Las señales de co-estimulación constituyen un testigo del estatus del medio extracelular y la naturaleza del antígeno, que permiten sincronizar e integrar el proceso replicativo con un contexto externo de inflamación inmunológica.

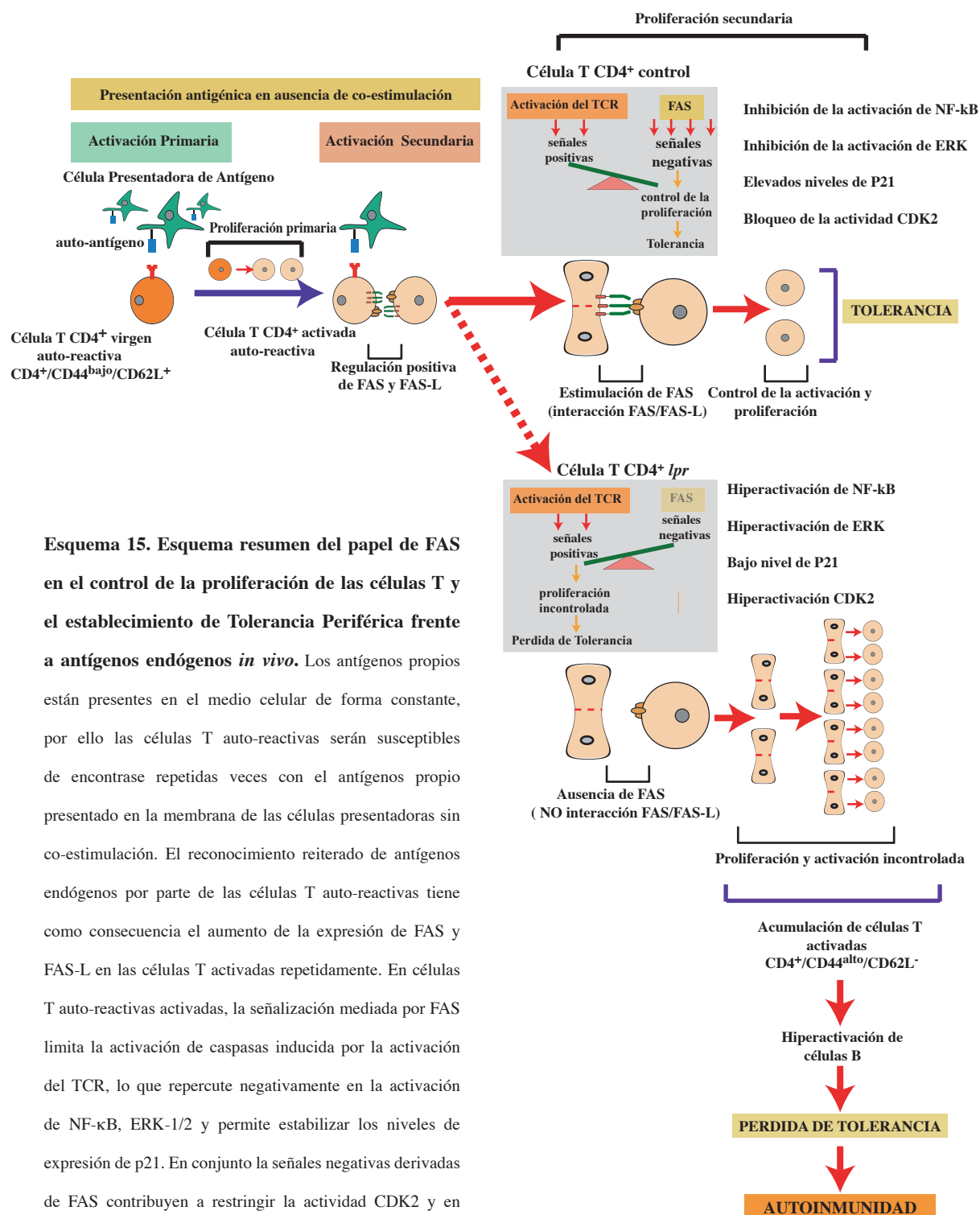
Sabemos que la activación reiterada de las células T provoca un aumento en la expresión de FAS y FAS-L¹⁸. Por su naturaleza endógena, los auto-antígenos están presentes en altas cantidades y no pueden ser eliminados del medio, por lo que una célula T auto-reactiva será susceptible de encontrarse reiteradamente con el antígeno específico, soportando ciclos de activación repetida. En esta Tesis hemos demostrado que FAS (tras interaccionar con FAS-L)

actúa autocrínamente como un regulador negativo de la activación y proliferación de las células T estimuladas repetidamente, regulando negativamente la activación de NF- κ B, ERK y CDK2 y estabilizando la expresión de p21. Según nuestro modelo de acción molecular, cuanto mayor señalización por FAS reciba una célula, mayor nivel de co-estimulación precisará para alcanzar los umbrales mínimos de activación requeridos para la función efectora y la proliferación. Basándonos en esta nueva función de FAS y en los resultados publicados con los modelos de inmunización *in vivo*, proponemos que el reconocimiento reiterado de un auto-antígeno por parte de una célula T auto-reactiva, en condiciones no inflamatorias, provoca una regulación positiva de FAS que tras interactuar con FAS-L impide la correcta activación y proliferación de la célula T. En esta Tesis, proponemos que este mecanismo de control es esencial para el establecimiento de Tolerancia Periférica. Según nuestra hipótesis, la ausencia de FAS en ratones y pacientes de ALPS reduce el umbral de activación de las células T, que en consecuencia pueden activarse y proliferan de forma continuada frente a ante antígenos presentados en ausencia de co-estimulación. Como consecuencia, la activación de las células T, tras el reconocimiento de antígenos endógenos, conduce a la misma secuencia efectora responsable de la eliminación de los agentes agresores (activación, proliferación, producción de mediadores inflamatorios, activación de células B... etc) provocando daño celular y autoinmunidad (Esquema 15).

Según el mecanismo de inhibición propuesto para FAS, la regulación negativa de la proliferación implica el bloqueo de la actividad de la forma no procesada de la C-8 tras la estimulación del receptor de antígeno de la célula T. Se ha demostrado que, además de actuar como mediador de la activación tras la estimulación del TCR, la C-8 media la activación celular dependiente del BCR⁸⁸ (del inglés abreviado, Receptor de Antígeno de la célula B), expresado en células B y TLR-4^{195,196}, expresado en células B y células dendríticas. Análogamente a lo descrito en células T, la señalización por FAS puede bloquear, de forma paracrina, la activación de NF- κ B inducida tras la estimulación del BCR y/o TLR-4, ejerciendo una función en la supresión de la inflamación excesiva, la destrucción de tejidos y el control de la tolerancia en situaciones de reposo.

Ya que la inducción de apoptosis mediada por FAS está subordinada a la presencia de un elevado número de células T auto-reactivas activadas, proponemos que el defecto en control de la proliferación frente auto-antígenos es un pre-requisito indispensable para el desarrollo de patologías autoinmunes.

La nueva función de FAS descrita en esta Tesis como un regulador negativo de la activación y proliferación de las células T revela nuevos aspectos acerca de la biología del sistema FAS/FAS-L. Los datos demuestran que los procesos bioquímicos que conducen a la proliferación y muerte de las células T están mutuamente relacionados y sujetos a una regulación común. Este concepto ofrece un nuevo punto de vista acerca de los mecanismo de control de la homeostasis inmunológica, permitiendo nuevos enfoques en el diseño de estrategias terapéuticas destinadas al tratamiento de enfermedades relacionadas con alteraciones en el equilibrio interno del Sistema Inmunológico.



Esquema 15. Esquema resumen del papel de FAS en el control de la proliferación de las células T y el establecimiento de Tolerancia Periférica frente a antígenos endógenos *in vivo*.

Los antígenos propios están presentes en el medio celular de forma constante, por ello las células T auto-reactivas serán susceptibles de encontrarse repetidas veces con el antígeno propio presentado en la membrana de las células presentadoras sin co-estimulación. El reconocimiento reiterado de antígenos endógenos por parte de las células T auto-reactivas tiene como consecuencia el aumento de la expresión de FAS y FAS-L en las células T activadas repetidamente. En células T auto-reactivas activadas, la señalización mediada por FAS limita la activación de caspasas inducida por la activación del TCR, lo que repercute negativamente en la activación de NF-κB, ERK-1/2 y permite estabilizar los niveles de expresión de p21. En conjunto las señales negativas derivadas de FAS contribuyen a restringir la actividad de CDK2 y en consecuencia la capacidad de activación y proliferación de las células T activadas. En un contexto homeostático, la señalización por FAS inhibe la respuesta proliferativa de las células T cuando la señal de activación procedente del reconocimiento antigénico no es lo suficientemente fuerte debido a la ausencia de co-estimulación. En ausencia de FAS, las células T activadas por auto-antígenos no reciben la señal negativa y por tanto se activan y proliferan ante antígenos propios, desencadenando una respuesta efectora (producción de citoquinas efectoras, activación de células B....) que conduce a la pérdida general de tolerancia y desarrollo de autoinmunidad.



VIII. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral han dado lugar a las siguientes conclusiones:

1. En células humanas y de ratón, tanto *in vitro* como *in vivo*, FAS ejerce un papel fundamental en el control específico de la proliferación de las células T activadas.
2. FAS actúa como un regulador negativo de la activación de la C-8 tras la estimulación del TCR, inhibiendo como consecuencia la activación de ERK-1/2 y NF- κ B .
3. La señalización mediada por FAS contribuye a estabilizar los niveles de expresión de p21^{waf1/cip1} tras la activación repetida, lo que redundará en una menor activación de CDK2 y menor proliferación de las células T.
4. La función anti-proliferativa de FAS es esencial en el control de la homeostasis inmunológica y el establecimiento de Tolerancia Periférica. El control de la proliferación de las células T *lpr in vivo* contribuye de forma significativa a aminorar el desarrollo de la patología autoinmune asociada a la falta de FAS.



IX. BIBLIOGRAFÍA

1. Banchereau, J. & Steinman, R. M. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **392**, 245-52 (1998).
2. Friedl, P. & Brocker, E. B. TCR triggering on the move: diversity of T-cell interactions with antigen-presenting cells. *Immunol Rev* **186**, 83-9 (2002).
3. Trinchieri, G. & Sher, A. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nat Rev Immunol* **7**, 179-90 (2007).
4. Iwasaki, A. & Medzhitov, R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol* **5**, 987-95 (2004).
5. Frauwirth, K. A. & Thompson, C. B. Activation and inhibition of lymphocytes by costimulation. *J Clin Invest* **109**, 295-9 (2002).
6. Alegre, M. L., Frauwirth, K. A. & Thompson, C. B. T-cell regulation by CD28 and CTLA-4. *Nat Rev Immunol* **1**, 220-8 (2001).
7. Aluvihare, V. R. & Betz, A. G. The role of regulatory T cells in alloantigen tolerance. *Immunol Rev* **212**, 330-43 (2006).
8. Bluestone, J. A. & Abbas, A. K. Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat Rev Immunol* **3**, 253-7 (2003).
9. Strasser, A. & Pellegrini, M. T-lymphocyte death during shutdown of an immune response. *Trends Immunol* **25**, 610-5 (2004).
10. Krammer, P. H. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* **407**, 789-95 (2000).
11. Surh, C. D., Boyman, O., Purton, J. F. & Sprent, J. Homeostasis of memory T cells. *Immunol Rev* **211**, 154-63 (2006).
12. Sprent, J. & Surh, C. D. T cell memory. *Annu Rev Immunol* **20**, 551-79 (2002).
13. Sprent, J. & Kishimoto, H. The thymus and negative selection. *Immunol Rev* **185**, 126-35 (2002).
14. Abbas, A. K. The control of T cell activation vs. tolerance. *Autoimmun Rev* **2**, 115-8 (2003).
15. Abbas, A. K., Lohr, J., Knoechel, B. & Nagabhushanam, V. T cell tolerance and autoimmunity. *Autoimmun Rev* **3**, 471-5 (2004).
16. Walker, L. S. & Abbas, A. K. The enemy within: keeping self-reactive T cells at bay in the periphery. *Nat Rev Immunol* **2**, 11-9 (2002).
17. Tang, Q. & Bluestone, J. A. Regulatory T-cell physiology and application to treat autoimmunity. *Immunol Rev* **212**, 217-37 (2006).
18. Green, D. R., Droin, N. & Pinkoski, M. Activation-induced cell death in T cells. *Immunol Rev* **193**, 70-81 (2003).
19. Krueger, A., Fas, S. C., Baumann, S. & Krammer, P. H. The role of CD95 in the regulation of peripheral T-cell apoptosis. *Immunol Rev* **193**, 58-69 (2003).
20. Strasser, A., O'Connor, L. & Dixit, V. M. Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem* **69**, 217-45 (2000).

21. Nagata, S. & Golstein, P. The Fas death factor. *Science* **267**, 1449-56 (1995).
22. Watanabe-Fukunaga, R., Brannan, C. I., Copeland, N. G., Jenkins, N. A. & Nagata, S. Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature* **356**, 314-7 (1992).
23. Singer, G. G., Carrera, A. C., Marshak-Rothstein, A., Martinez, C. & Abbas, A. K. Apoptosis, Fas and systemic autoimmunity: the MRL-lpr/lpr model. *Curr Opin Immunol* **6**, 913-20 (1994).
24. Theofilopoulos, A. N. Genetics of systemic autoimmunity. *J Autoimmun* **9**, 207-10 (1996).
25. Bidere, N., Su, H. C. & Lenardo, M. J. Genetic disorders of programmed cell death in the immune system. *Annu Rev Immunol* **24**, 321-52 (2006).
26. Fisher, G. H. et al. Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Cell* **81**, 935-46 (1995).
27. Nagata, S. Human autoimmune lymphoproliferative syndrome, a defect in the apoptosis-inducing Fas receptor: a lesson from the mouse model. *J Hum Genet* **43**, 2-8 (1998).
28. Mountz, J. D., Wu, J., Cheng, J. & Zhou, T. Autoimmune disease. A problem of defective apoptosis. *Arthritis Rheum* **37**, 1415-20 (1994).
29. Rieux-Laucat, F., Le Deist, F. & Fischer, A. Autoimmune lymphoproliferative syndromes: genetic defects of apoptosis pathways. *Cell Death Differ* **10**, 124-33 (2003).
30. Van Parijs, L., Biuckians, A. & Abbas, A. K. Functional roles of Fas and Bcl-2-regulated apoptosis of T lymphocytes. *J Immunol* **160**, 2065-71 (1998).
31. Singer, G. G. & Abbas, A. K. The fas antigen is involved in peripheral but not thymic deletion of T lymphocytes in T cell receptor transgenic mice. *Immunity* **1**, 365-71 (1994).
32. Kotzin, B. L., Babcock, S. K. & Herron, L. R. Deletion of potentially self-reactive T cell receptor specificities in L3T4-, Lym-2- T cells of lpr mice. *J Exp Med* **168**, 2221-9 (1988).
33. Singer, P. A., Balderas, R. S., McEvilly, R. J., Bobardt, M. & Theofilopoulos, A. N. Tolerance-related V beta clonal deletions in normal CD4-8-, TCR-alpha/beta + and abnormal lpr and gld cell populations. *J Exp Med* **170**, 1869-77 (1989).
34. Pellegrini, M., Belz, G., Bouillet, P. & Strasser, A. Shutdown of an acute T cell immune response to viral infection is mediated by the proapoptotic Bcl-2 homology 3-only protein Bim. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 14175-80 (2003).
35. Strasser, A., Harris, A. W., Huang, D. C., Krammer, P. H. & Cory, S. Bcl-2 and Fas/APO-1 regulate distinct pathways to lymphocyte apoptosis. *Embo J* **14**, 6136-47 (1995).
36. Van Parijs, L., Peterson, D. A. & Abbas, A. K. The Fas/Fas ligand pathway and Bcl-2 regulate T cell responses to model self and foreign antigens. *Immunity* **8**, 265-74 (1998).
37. Kurts, C., Heath, W. R., Kosaka, H., Miller, J. F. & Carbone, F. R. The peripheral deletion of autoreactive CD8+ T cells induced by cross-presentation of self-antigens involves

- signaling through CD95 (Fas, Apo-1). *J Exp Med* **188**, 415-20 (1998).
38. Van Parijs, L., Ibraghimov, A. & Abbas, A. K. The roles of costimulation and Fas in T cell apoptosis and peripheral tolerance. *Immunity* **4**, 321-8 (1996).
 39. Mixer, P. F., Russell, J. Q. & Budd, R. C. Delayed kinetics of T lymphocyte anergy and deletion in lpr mice. *J Autoimmun* **7**, 697-710 (1994).
 40. Ogasawara, J. et al. Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. *Nature* **364**, 806-9 (1993).
 41. Wajant, H. Death receptors. *Essays Biochem* **39**, 53-71 (2003).
 42. Chinnaiyan, A. M., O'Rourke, K., Tewari, M. & Dixit, V. M. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* **81**, 505-12 (1995).
 43. Boldin, M. P. et al. A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain. *J Biol Chem* **270**, 7795-8 (1995).
 44. Tibbetts, M. D., Zheng, L. & Lenardo, M. J. The death effector domain protein family: regulators of cellular homeostasis. *Nat Immunol* **4**, 404-9 (2003).
 45. Li-Weber, M. & Krammer, P. H. Function and regulation of the CD95 (APO-1/Fas) ligand in the immune system. *Semin Immunol* **15**, 145-57 (2003).
 46. Van Parijs, L. et al. Uncoupling IL-2 signals that regulate T cell proliferation, survival, and Fas-mediated activation-induced cell death. *Immunity* **11**, 281-8 (1999).
 47. Zheng, L., Trageser, C. L., Willerford, D. M. & Lenardo, M. J. T cell growth cytokines cause the superinduction of molecules mediating antigen-induced T lymphocyte death. *J Immunol* **160**, 763-9 (1998).
 48. Lenardo, M. J. Interleukin-2 programs mouse alpha beta T lymphocytes for apoptosis. *Nature* **353**, 858-61 (1991).
 49. Siegel, R. M. et al. Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations. *Science* **288**, 2354-7 (2000).
 50. Peter, M. E. & Krammer, P. H. The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death Differ* **10**, 26-35 (2003).
 51. Siegel, R. M. et al. SPOTS: signaling protein oligomeric transduction structures are early mediators of death receptor-induced apoptosis at the plasma membrane. *J Cell Biol* **167**, 735-44 (2004).
 52. Lee, K. H. et al. The role of receptor internalization in CD95 signaling. *Embo J* **25**, 1009-23 (2006).
 53. Barnhart, B. C., Lee, J. C., Alappat, E. C. & Peter, M. E. The death effector domain protein family. *Oncogene* **22**, 8634-44 (2003).
 54. Kumar, S. Caspase function in programmed cell death. *Cell Death Differ* **14**, 32-43 (2007).
 55. Lamkanfi, M., Festjens, N., Declercq, W., Vanden Berghe, T. & Vandenabeele, P. Caspases in cell survival, proliferation and differentiation. *Cell Death Differ* **14**, 44-55 (2007).

56. Shi, Y. Caspase activation: revisiting the induced proximity model. *Cell* **117**, 855-8 (2004).
57. Martin, D. A., Siegel, R. M., Zheng, L. & Lenardo, M. J. Membrane oligomerization and cleavage activates the caspase-8 (FLICE/MACHalpha1) death signal. *J Biol Chem* **273**, 4345-9 (1998).
58. Scaffidi, C. et al. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *Embo J* **17**, 1675-87 (1998).
59. Barnhart, B. C., Alappat, E. C. & Peter, M. E. The CD95 type I/type II model. *Semin Immunol* **15**, 185-93 (2003).
60. Budd, R. C., Yeh, W. C. & Tschopp, J. cFLIP regulation of lymphocyte activation and development. *Nat Rev Immunol* **6**, 196-204 (2006).
61. Irmeler, M. et al. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* **388**, 190-5 (1997).
62. Thome, M. et al. Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors. *Nature* **386**, 517-21 (1997).
63. Scaffidi, C., Schmitz, I., Krammer, P. H. & Peter, M. E. The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis. *J Biol Chem* **274**, 1541-8 (1999).
64. Wang, J. et al. Inhibition of Fas-mediated apoptosis by the B cell antigen receptor through c-FLIP. *Eur J Immunol* **30**, 155-63 (2000).
65. Rieux-Laucat, F. Inherited and acquired death receptor defects in human Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome. *Curr Dir Autoimmun* **9**, 18-36 (2006).
66. Fleisher, T. A., Straus, S. E. & Bleesing, J. J. A genetic disorder of lymphocyte apoptosis involving the fas pathway: the autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Curr Allergy Asthma Rep* **1**, 534-40 (2001).
67. Straus, S. E., Sneller, M., Lenardo, M. J., Puck, J. M. & Strober, W. An inherited disorder of lymphocyte apoptosis: the autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Ann Intern Med* **130**, 591-601 (1999).
68. Straus, S. E. et al. The development of lymphomas in families with autoimmune lymphoproliferative syndrome with germline Fas mutations and defective lymphocyte apoptosis. *Blood* **98**, 194-200 (2001).
69. Nagata, S. & Suda, T. Fas and Fas ligand: lpr and gld mutations. *Immunol Today* **16**, 39-43 (1995).
70. Rieux-Laucat, F., Fischer, A. & Deist, F. L. Cell-death signaling and human disease. *Curr Opin Immunol* **15**, 325-31 (2003).
71. Kimura, M. & Matsuzawa, A. Autoimmunity in mice bearing lprcg: a novel mutant gene. *Int Rev Immunol* **11**, 193-210 (1994).
72. Adachi, M. et al. Targeted mutation in the Fas gene causes hyperplasia in peripheral lymphoid organs and liver. *Nat Genet* **11**, 294-300 (1995).
73. Lynch, D. H. et al. The mouse Fas-ligand gene is mutated in gld mice and is part of a TNF

- family gene cluster. *Immunity* **1**, 131-6 (1994).
74. Ramsdell, F. et al. gld/gld mice are unable to express a functional ligand for Fas. *Eur J Immunol* **24**, 928-33 (1994).
 75. Yeh, W. C. et al. FADD: essential for embryo development and signaling from some, but not all, inducers of apoptosis. *Science* **279**, 1954-8 (1998).
 76. Newton, K., Harris, A. W., Bath, M. L., Smith, K. G. & Strasser, A. A dominant interfering mutant of FADD/MORT1 enhances deletion of autoreactive thymocytes and inhibits proliferation of mature T lymphocytes. *Embo J* **17**, 706-18 (1998).
 77. Walsh, C. M. et al. A role for FADD in T cell activation and development. *Immunity* **8**, 439-49 (1998).
 78. Strasser, A. & Newton, K. FADD/MORT1, a signal transducer that can promote cell death or cell growth. *Int J Biochem Cell Biol* **31**, 533-7 (1999).
 79. Newton, K., Kurts, C., Harris, A. W. & Strasser, A. Effects of a dominant interfering mutant of FADD on signal transduction in activated T cells. *Curr Biol* **11**, 273-6 (2001).
 80. Mack, A. & Hacker, G. Inhibition of caspase or FADD function blocks proliferation but not MAP kinase-activation and interleukin-2-production during primary stimulation of T cells. *Eur J Immunol* **32**, 1986-92 (2002).
 81. Beisner, D. R., Chu, I. H., Arechiga, A. F., Hedrick, S. M. & Walsh, C. M. The requirements for Fas-associated death domain signaling in mature T cell activation and survival. *J Immunol* **171**, 247-56 (2003).
 82. Zhang, J., Kabra, N. H., Cado, D., Kang, C. & Winoto, A. FADD-deficient T cells exhibit a disaccord in regulation of the cell cycle machinery. *J Biol Chem* **276**, 29815-8 (2001).
 83. Zhang, J., Cado, D., Chen, A., Kabra, N. H. & Winoto, A. Fas-mediated apoptosis and activation-induced T-cell proliferation are defective in mice lacking FADD/Mort1. *Nature* **392**, 296-300 (1998).
 84. Siegel, R. M. Caspases at the crossroads of immune-cell life and death. *Nat Rev Immunol* **6**, 308-17 (2006).
 85. Los, M., Stroh, C., Janicke, R. U., Engels, I. H. & Schulze-Osthoff, K. Caspases: more than just killers? *Trends Immunol* **22**, 31-4 (2001).
 86. Kennedy, N. J., Kataoka, T., Tschopp, J. & Budd, R. C. Caspase activation is required for T cell proliferation. *J Exp Med* **190**, 1891-6 (1999).
 87. Alam, A., Cohen, L. Y., Aouad, S. & Sekaly, R. P. Early activation of caspases during T lymphocyte stimulation results in selective substrate cleavage in nonapoptotic cells. *J Exp Med* **190**, 1879-90 (1999).
 88. Chun, H. J. et al. Pleiotropic defects in lymphocyte activation caused by caspase-8 mutations lead to human immunodeficiency. *Nature* **419**, 395-9 (2002).
 89. Salmena, L. et al. Essential role for caspase 8 in T-cell homeostasis and T-cell-mediated immunity. *Genes Dev* **17**, 883-95 (2003).
 90. Salmena, L. & Hakem, R. Caspase-8 deficiency in T cells leads to a lethal lymphoinfiltrative

- immune disorder. *J Exp Med* **202**, 727-32 (2005).
91. Su, H. et al. Requirement for caspase-8 in NF-kappaB activation by antigen receptor. *Science* **307**, 1465-8 (2005).
 92. Bidere, N., Snow, A. L., Sakai, K., Zheng, L. & Lenardo, M. J. Caspase-8 regulation by direct interaction with TRAF6 in T cell receptor-induced NF-kappaB activation. *Curr Biol* **16**, 1666-71 (2006).
 93. Misra, R. S. et al. Caspase-8 and c-FLIPL associate in lipid rafts with NF-kappa B adaptors during T cell activation. *J Biol Chem* (2007).
 94. Dohrman, A. et al. Cellular FLIP (long form) regulates CD8+ T cell activation through caspase-8-dependent NF-kappa B activation. *J Immunol* **174**, 5270-8 (2005).
 95. Li, Q. & Verma, I. M. NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol* **2**, 725-34 (2002).
 96. Altman, A. & Villalba, M. Protein kinase C-theta (PKCtheta): it's all about location, location, location. *Immunol Rev* **192**, 53-63 (2003).
 97. Altman, A. & Villalba, M. Protein kinase C-theta (PKC theta): a key enzyme in T cell life and death. *J Biochem (Tokyo)* **132**, 841-6 (2002).
 98. Sun, Z. et al. PKC-theta is required for TCR-induced NF-kappaB activation in mature but not immature T lymphocytes. *Nature* **404**, 402-7 (2000).
 99. Egawa, T. et al. Requirement for CARMA1 in antigen receptor-induced NF-kappa B activation and lymphocyte proliferation. *Curr Biol* **13**, 1252-8 (2003).
 100. Rueda, D. & Thome, M. Phosphorylation of CARMA1: the link(er) to NF-kappaB activation. *Immunity* **23**, 551-3 (2005).
 101. Sommer, K. et al. Phosphorylation of the CARMA1 linker controls NF-kappaB activation. *Immunity* **23**, 561-74 (2005).
 102. Matsumoto, R. et al. Phosphorylation of CARMA1 plays a critical role in T Cell receptor-mediated NF-kappaB activation. *Immunity* **23**, 575-85 (2005).
 103. Thome, M. CARMA1, BCL-10 and MALT1 in lymphocyte development and activation. *Nat Rev Immunol* **4**, 348-59 (2004).
 104. Rawlings, D. J., Sommer, K. & Moreno-Garcia, M. E. The CARMA1 signalosome links the signalling machinery of adaptive and innate immunity in lymphocytes. *Nat Rev Immunol* **6**, 799-812 (2006).
 105. Vidal, A. & Koff, A. Cell-cycle inhibitors: three families united by a common cause. *Gene* **247**, 1-15 (2000).
 106. Wells, A. D. Cyclin-dependent kinases: Molecular switches controlling anergy and potential therapeutic targets for tolerance. *Semin Immunol* (2007).
 107. Rowell, E. A. & Wells, A. D. The role of cyclin-dependent kinases in T-cell development, proliferation, and function. *Crit Rev Immunol* **26**, 189-212 (2006).
 108. Dotto, G. P. p21(WAF1/Cip1): more than a break to the cell cycle? *Biochim Biophys Acta* **1471**, M43-56 (2000).

109. Balomenos, D. et al. The cell cycle inhibitor p21 controls T-cell proliferation and sex-linked lupus development. *Nat Med* **6**, 171-6 (2000).
110. Arias, C. F. et al. p21CIP1/WAF1 Controls Proliferation of Activated/Memory T Cells and Affects Homeostasis and Memory T Cell Responses. *J Immunol* **178**, 2296-306 (2007).
111. Goulvestre, C. et al. A mimic of p21WAF1/CIP1 ameliorates murine lupus. *J Immunol* **175**, 6959-67 (2005).
112. Salvador, J. M. et al. Mice lacking the p53-effector gene Gadd45a develop a lupus-like syndrome. *Immunity* **16**, 499-508 (2002).
113. Santiago-Raber, M. L. et al. Role of cyclin kinase inhibitor p21 in systemic autoimmunity. *J Immunol* **167**, 4067-74 (2001).
114. Murga, M. et al. Mutation of E2F2 in mice causes enhanced T lymphocyte proliferation, leading to the development of autoimmunity. *Immunity* **15**, 959-70 (2001).
115. Liu, L. et al. Gadd45 beta and Gadd45 gamma are critical for regulating autoimmunity. *J Exp Med* **202**, 1341-7 (2005).
116. Balomenos, D. & Martinez, A. C. Cell-cycle regulation in immunity, tolerance and autoimmunity. *Immunol Today* **21**, 551-5 (2000).
117. Fortner, K. A. & Budd, R. C. The death receptor Fas (CD95/APO-1) mediates the deletion of T lymphocytes undergoing homeostatic proliferation. *J Immunol* **175**, 4374-82 (2005).
118. Balomenos, D., Rumold, R. & Theofilopoulos, A. N. The proliferative in vivo activities of lpr double-negative T cells and the primary role of p59fyn in their activation and expansion. *J Immunol* **159**, 2265-73 (1997).
119. Le Deist, F. et al. Clinical, immunological, and pathological consequences of Fas-deficient conditions. *Lancet* **348**, 719-23 (1996).
120. Lim, M. S. et al. Pathological findings in human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Am J Pathol* **153**, 1541-50 (1998).
121. Fotedar, R. et al. Effect of p21waf1/cip1 transgene on radiation induced apoptosis in T cells. *Oncogene* **18**, 3652-8 (1999).
122. Balomenos, D., Rumold, R. & Theofilopoulos, A. N. Interferon-gamma is required for lupus-like disease and lymphoaccumulation in MRL-lpr mice. *J Clin Invest* **101**, 364-71 (1998).
123. Lopez-Rodriguez, C., Zubiaur, M., Sancho, J., Concha, A. & Corbi, A. L. An octamer element functions as a regulatory element in the differentiation-responsive CD11c integrin gene promoter: OCT-2 inducibility during myelomonocytic differentiation. *J Immunol* **158**, 5833-40 (1997).
124. Morin, C. L., Schlaepfer, I. R. & Eckel, R. H. Tumor necrosis factor-alpha eliminates binding of NF-Y and an octamer-binding protein to the lipoprotein lipase promoter in 3T3-L1 adipocytes. *J Clin Invest* **95**, 1684-9 (1995).

125. Espejel, S. et al. Mammalian Ku86 mediates chromosomal fusions and apoptosis caused by critically short telomeres. *Embo J* **21**, 2207-19 (2002).
126. Blasco, M. A., Rizen, M., Greider, C. W. & Hanahan, D. Differential regulation of telomerase activity and telomerase RNA during multi-stage tumorigenesis. *Nat Genet* **12**, 200-4 (1996).
127. Berden, J. H., Hang, L., McConahey, P. J. & Dixon, F. J. Analysis of vascular lesions in murine SLE. I. Association with serologic abnormalities. *J Immunol* **130**, 1699-705 (1983).
128. Slee, E. A. et al. Benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp (OMe) fluoromethylketone (Z-VAD.FMK) inhibits apoptosis by blocking the processing of CPP32. *Biochem J* **315** (Pt 1), 21-4 (1996).
129. Roths, J. B., Murphy, E. D. & Eicher, E. M. A new mutation, gld, that produces lymphoproliferation and autoimmunity in C3H/HeJ mice. *J Exp Med* **159**, 1-20 (1984).
130. Takahashi, T. et al. Generalized lymphoproliferative disease in mice, caused by a point mutation in the Fas ligand. *Cell* **76**, 969-76 (1994).
131. Reap, E. A., Leslie, D., Abrahams, M., Eisenberg, R. A. & Cohen, P. L. Apoptosis abnormalities of splenic lymphocytes in autoimmune lpr and gld mice. *J Immunol* **154**, 936-43 (1995).
132. Desbarats, J., Duke, R. C. & Newell, M. K. Newly discovered role for Fas ligand in the cell-cycle arrest of CD4+ T cells. *Nat Med* **4**, 1377-82 (1998).
133. Sun, M., Ames, K. T., Suzuki, I. & Fink, P. J. The cytoplasmic domain of Fas ligand costimulates TCR signals. *J Immunol* **177**, 1481-91 (2006).
134. Suzuki, I., Martin, S., Boursalian, T. E., Beers, C. & Fink, P. J. Fas ligand costimulates the in vivo proliferation of CD8+ T cells. *J Immunol* **165**, 5537-43 (2000).
135. Suzuki, I. & Fink, P. J. The dual functions of fas ligand in the regulation of peripheral CD8+ and CD4+ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 1707-12 (2000).
136. Newell, M. K. & Desbarats, J. Fas ligand: receptor or ligand? *Apoptosis* **4**, 311-5 (1999).
137. Nagata, S. Mutations in the Fas antigen gene in lpr mice. *Semin Immunol* **6**, 3-8 (1994).
138. Rieux-Laucat, F. [Autoimmune lymphoproliferative syndrome: an inherited or a somatic defect of apoptosis]. *Med Sci (Paris)* **22**, 645-50 (2006).
139. Blasco, M. A. Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat Rev Genet* **6**, 611-22 (2005).
140. Blasco, M. A. Telomerase beyond telomeres. *Nat Rev Cancer* **2**, 627-33 (2002).
141. Wong, J. M. & Collins, K. Telomere maintenance and disease. *Lancet* **362**, 983-8 (2003).
142. Blasco, M. A. & Hahn, W. C. Evolving views of telomerase and cancer. *Trends Cell Biol* **13**, 289-94 (2003).
143. Falk, M. et al. Caspase inhibition blocks human T cell proliferation by suppressing

- appropriate regulation of IL-2, CD25, and cell cycle-associated proteins. *J Immunol* **173**, 5077-85 (2004).
144. Ruland, J. & Mak, T. W. Transducing signals from antigen receptors to nuclear factor kappaB. *Immunol Rev* **193**, 93-100 (2003).
 145. Voll, R. E. et al. NF-kappa B activation by the pre-T cell receptor serves as a selective survival signal in T lymphocyte development. *Immunity* **13**, 677-89 (2000).
 146. Dohrman, A. et al. Cellular FLIP long form augments caspase activity and death of T cells through heterodimerization with and activation of caspase-8. *J Immunol* **175**, 311-8 (2005).
 147. Micheau, O. et al. The long form of FLIP is an activator of caspase-8 at the Fas death-inducing signaling complex. *J Biol Chem* **277**, 45162-71 (2002).
 148. Boatright, K. M., Deis, C., Denault, J. B., Sutherlin, D. P. & Salvesen, G. S. Activation of caspases-8 and -10 by FLIP(L). *Biochem J* **382**, 651-7 (2004).
 149. Kataoka, T. & Tschopp, J. N-terminal fragment of c-FLIP(L) processed by caspase 8 specifically interacts with TRAF2 and induces activation of the NF-kappaB signaling pathway. *Mol Cell Biol* **24**, 2627-36 (2004).
 150. Kataoka, T. et al. The caspase-8 inhibitor FLIP promotes activation of NF-kappaB and Erk signaling pathways. *Curr Biol* **10**, 640-8 (2000).
 151. Hueber, A. O., Zornig, M., Bernard, A. M., Chautan, M. & Evan, G. A dominant negative Fas-associated death domain protein mutant inhibits proliferation and leads to impaired calcium mobilization in both T-cells and fibroblasts. *J Biol Chem* **275**, 10453-62 (2000).
 152. Zhang, Y. L. & Dong, C. MAP kinases in immune responses. *Cell Mol Immunol* **2**, 20-7 (2005).
 153. Dong, C., Davis, R. J. & Flavell, R. A. MAP kinases in the immune response. *Annu Rev Immunol* **20**, 55-72 (2002).
 154. Chang, F. et al. Regulation of cell cycle progression and apoptosis by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway (Review). *Int J Oncol* **22**, 469-80 (2003).
 155. Nel, A. E. T-cell activation through the antigen receptor. Part 1: signaling components, signaling pathways, and signal integration at the T-cell antigen receptor synapse. *J Allergy Clin Immunol* **109**, 758-70 (2002).
 156. Nel, A. E. & Slaughter, N. T-cell activation through the antigen receptor. Part 2: role of signaling cascades in T-cell differentiation, anergy, immune senescence, and development of immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* **109**, 901-15 (2002).
 157. Krieger, P. M., Saemann, M. D., Bohmig, G. A., Muhlbacher, F. & Zlabinger, G. J. Targeting the ERK-1/2 signalling pathway results in alloantigen-specific anergy in human T cells. *Transplant Proc* **34**, 1403-4 (2002).
 158. Adams, C. L., Grierson, A. M., Mowat, A. M., Harnett, M. M. & Garside, P. Differences in the kinetics, amplitude, and localization of ERK activation in anergy and priming revealed at the level of individual primary T cells by laser scanning cytometry. *J Immunol*

- 173**, 1579-86 (2004).
159. Luschen, S. et al. The Fas-associated death domain protein/caspase-8/c-FLIP signaling pathway is involved in TNF-induced activation of ERK. *Exp Cell Res* **310**, 33-42 (2005).
 160. Coqueret, O. New roles for p21 and p27 cell-cycle inhibitors: a function for each cell compartment? *Trends Cell Biol* **13**, 65-70 (2003).
 161. Woo, M. et al. Caspase-3 regulates cell cycle in B cells: a consequence of substrate specificity. *Nat Immunol* **4**, 1016-22 (2003).
 162. Levkau, B. et al. Cleavage of p21Cip1/Waf1 and p27Kip1 mediates apoptosis in endothelial cells through activation of Cdk2: role of a caspase cascade. *Mol Cell* **1**, 553-63 (1998).
 163. Gervais, J. L., Seth, P. & Zhang, H. Cleavage of CDK inhibitor p21(Cip1/Waf1) by caspases is an early event during DNA damage-induced apoptosis. *J Biol Chem* **273**, 19207-12 (1998).
 164. Puck, J. M. & Sneller, M. C. ALPS: an autoimmune human lymphoproliferative syndrome associated with abnormal lymphocyte apoptosis. *Semin Immunol* **9**, 77-84 (1997).
 165. Smith, K. G., Strasser, A. & Vaux, D. L. CrmA expression in T lymphocytes of transgenic mice inhibits CD95 (Fas/APO-1)-transduced apoptosis, but does not cause lymphadenopathy or autoimmune disease. *Embo J* **15**, 5167-76 (1996).
 166. Rathmell, J. C. & Thompson, C. B. Pathways of apoptosis in lymphocyte development, homeostasis, and disease. *Cell* **109 Suppl**, S97-107 (2002).
 167. Lens, S. M. et al. The caspase 8 inhibitor c-FLIP(L) modulates T-cell receptor-induced proliferation but not activation-induced cell death of lymphocytes. *Mol Cell Biol* **22**, 5419-33 (2002).
 168. Mora, A. L. et al. Antiapoptotic function of NF-kappaB in T lymphocytes is influenced by their differentiation status: roles of Fas, c-FLIP, and Bcl-xL. *Cell Death Differ* **10**, 1032-44 (2003).
 169. Micheau, O., Lens, S., Gaide, O., Alevizopoulos, K. & Tschopp, J. NF-kappaB signals induce the expression of c-FLIP. *Mol Cell Biol* **21**, 5299-305 (2001).
 170. Collado, M. et al. Inhibition of the phosphoinositide 3-kinase pathway induces a senescence-like arrest mediated by p27Kip1. *J Biol Chem* **275**, 21960-8 (2000).
 171. Zhou, B. B., Li, H., Yuan, J. & Kirschner, M. W. Caspase-dependent activation of cyclin-dependent kinases during Fas-induced apoptosis in Jurkat cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 6785-90 (1998).
 172. Collette, Y., Razanajaona, D., Ghiotto, M. & Olive, D. CD28 can promote T cell survival through a phosphatidylinositol 3-kinase-independent mechanism. *Eur J Immunol* **27**, 3283-9 (1997).
 173. Kerstan, A. & Hunig, T. Cutting edge: distinct TCR- and CD28-derived signals regulate CD95L, Bcl-xL, and the survival of primary T cells. *J Immunol* **172**, 1341-5 (2004).

174. Lee, K. Y., D'Acquisto, F., Hayden, M. S., Shim, J. H. & Ghosh, S. PDK1 nucleates T cell receptor-induced signaling complex for NF-kappaB activation. *Science* **308**, 114-8 (2005).
175. Villalba, M. et al. Translocation of PKC[theta] in T cells is mediated by a nonconventional, PI3-K- and Vav-dependent pathway, but does not absolutely require phospholipase C. *J Cell Biol* **157**, 253-63 (2002).
176. Coudronniere, N., Villalba, M., Englund, N. & Altman, A. NF-kappa B activation induced by T cell receptor/CD28 costimulation is mediated by protein kinase C-theta. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 3394-9 (2000).
177. Okkenhaug, K., Bilancio, A., Emery, J. L. & Vanhaesebroeck, B. Phosphoinositide 3-kinase in T cell activation and survival. *Biochem Soc Trans* **32**, 332-5 (2004).
178. Panka, D. J., Mano, T., Suhara, T., Walsh, K. & Mier, J. W. Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt activity regulates c-FLIP expression in tumor cells. *J Biol Chem* **276**, 6893-6 (2001).
179. Moriyama, H. & Yonehara, S. Rapid up-regulation of c-FLIP expression by BCR signaling through the PI3K/Akt pathway inhibits simultaneously induced Fas-mediated apoptosis in murine B lymphocytes. *Immunol Lett* **109**, 36-46 (2007).
180. Fang, L. W., Tai, T. S., Yu, W. N., Liao, F. & Lai, M. Z. Phosphatidylinositide 3-kinase priming couples c-FLIP to T cell activation. *J Biol Chem* **279**, 13-8 (2004).
181. Barber, D. F. et al. PI3Kgamma inhibition blocks glomerulonephritis and extends lifespan in a mouse model of systemic lupus. *Nat Med* **11**, 933-5 (2005).
182. Barber, D. F. et al. Class IB-phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) deficiency ameliorates IA-PI3K-induced systemic lupus but not T cell invasion. *J Immunol* **176**, 589-93 (2006).
183. Reich, A., Korner, H., Sedgwick, J. D. & Pircher, H. Immune down-regulation and peripheral deletion of CD8 T cells does not require TNF receptor-ligand interactions nor CD95 (Fas, APO-1). *Eur J Immunol* **30**, 678-82 (2000).
184. Lohman, B. L., Razvi, E. S. & Welsh, R. M. T-lymphocyte downregulation after acute viral infection is not dependent on CD95 (Fas) receptor-ligand interactions. *J Virol* **70**, 8199-203 (1996).
185. Muschen, M., Rajewsky, K., Kronke, M. & Kuppers, R. The origin of CD95-gene mutations in B-cell lymphoma. *Trends Immunol* **23**, 75-80 (2002).
186. Beltinger, C. et al. Mutation analysis of CD95 (APO-1/Fas) in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* **102**, 722-8 (1998).
187. Beltinger, C. et al. CD95 (APO-1/Fas) mutations in childhood T-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **91**, 3943-51 (1998).
188. Beltinger, C., Bohler, T., Schrappe, M., Ludwig, W. D. & Debatin, K. M. [The role of CD95 (APO-1/Fas) mutations in lymphoproliferative and malignant lymphatic diseases]. *Klin Padiatr* **210**, 153-8 (1998).
189. Tamiya, S., Etoh, K., Suzushima, H., Takatsuki, K. & Matsuoka, M. Mutation of CD95

- (Fas/Apo-1) gene in adult T-cell leukemia cells. *Blood* **91**, 3935-42 (1998).
190. Gronbaek, K. et al. Somatic Fas mutations in non-Hodgkin's lymphoma: association with extranodal disease and autoimmunity. *Blood* **92**, 3018-24 (1998).
 191. French, L. E. & Tschopp, J. Defective death receptor signaling as a cause of tumor immune escape. *Semin Cancer Biol* **12**, 51-5 (2002).
 192. Li, Q., Withoff, S. & Verma, I. M. Inflammation-associated cancer: NF-kappaB is the lynchpin. *Trends Immunol* **26**, 318-25 (2005).
 193. Bullani, R. R. et al. Selective expression of FLIP in malignant melanocytic skin lesions. *J Invest Dermatol* **117**, 360-4 (2001).
 194. Bringold, F. & Serrano, M. Tumor suppressors and oncogenes in cellular senescence. *Exp Gerontol* **35**, 317-29 (2000).
 195. Beisner, D. R., Ch'en, I. L., Kolla, R. V., Hoffmann, A. & Hedrick, S. M. Cutting edge: innate immunity conferred by B cells is regulated by caspase-8. *J Immunol* **175**, 3469-73 (2005).
 196. Lemmers, B. et al. Essential role for caspase-8 in toll-like receptors and NFkappa B signalling. *J Biol Chem* (2007).



X. ANEXOS

Fas regulates activated T cell cycling and homeostasis in an apoptosis-independent manner

André Ballesteros-Tato¹, M^a Cruz García Ródriguez², Marianna Trakala¹, Andrés Canela³, Arun Fotedar⁴, María A. Blasco³, Carlos Martínez-A¹ and Dimitrios Balomenos¹

¹Department of Immunology and Oncology, Centro Nacional de Biotecnología/CSIC, UAM Campus de Cantoblanco, E-28049 Madrid; ²Unidad de Inmunología, Hospital La Paz, Madrid; ³Telomeres and Telomerase Group, Molecular Oncology Program 1, Spanish National Cancer Centre (CNIO), Madrid, Spain, and ⁴Cancer Cell Biology Program, Sidney Kimmel Cancer Center, San Diego, CA USA

Corresponding author: Dimitrios Balomenos
Department of Immunology and Oncology
Centro Nacional de Biotecnología/CSIC
Darwin 3
UAM Campus de Cantoblanco
E-28049 Madrid Spain
Tel (+34) 91/ 585-5449
Fax (+34) 91/ 372-0493
Email dbalomenos@cnb.uam.es

Homeostasis regulates total lymphocyte number by balancing cell growth and death. Programmed cell death, referred to as apoptosis, eliminates activated or autoreactive lymphocytes, and is thus important for immune system homeostasis. Interaction of the tumor necrosis factor receptor Fas with its ligand (FasL) induces apoptosis by recruiting an adaptor protein, the Fas-associated death domain (FADD), which activates a caspase cascade and apoptosis¹. Fas-triggered T cell apoptosis is considered central to lymphocyte homeostasis and tolerance induction². Fas-deficient (*lpr*) mice, as well as autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS) patients bearing Fas mutations^{3,4} develop lymphadenopathy (with increased CD4⁺CD8⁻TCR⁺ T cells (double-negative; DN)). The basis of lymphadenopathy development remains elusive, however, as defective apoptosis alone cannot account for T cell accumulation. Mouse models in which early Fas/FasL pathway apoptosis components, such as FADD and caspase-8, are deleted do not reproduce the *lpr* phenotype^{3,5-8}. Since FADD and caspase-8 control both T cell apoptosis and proliferation, a connection was proposed between these two processes^{3,9-11}. Here we describe a previously unknown Fas function in negatively regulating proliferation of apoptosis-surviving T cells. T cells from *lpr* mice and ALPS patients hyperproliferated after repeated activation. Hyperproliferation is due to caspase-dependent NF- κ B hyperactivation and reduced p21 expression. Inhibition of hyperproliferation by Fas has biological significance, since *in vivo* reduction of T cell proliferation in *lpr* mice restored homeostasis and reduced lymphadenopathy. We conclude that to maintain homeostasis, Fas both induces apoptosis and regulates proliferation of activated T cells. Regulation of T cell proliferation may be of value for the design of treatments for disorders of uncontrolled T cell expansion.

To examine whether Fas has a role in the regulation of activated T cell cycling, we analyzed proliferation of apoptosis-resistant *lpr* CD4⁺ T cells after secondary and successive T cell receptor (TCR) stimulation. Fas deficiency did not alter primary proliferative responses, but led to a marked increase in proliferation after secondary concanavalin A (ConA) treatment preceded by 6-day IL-2-dependent expansion (Fig. 1A and Supplementary Fig. 1A). *lpr* T cells hyperproliferated for at least eight treatment rounds, whereas wild-type (wt) T cells responded to only three activation rounds (Fig. 1A). Secondary treatment led to apoptosis of most wt T cells, while *lpr* T cells resisted apoptosis (Supplementary Fig. 1B). Fas deficiency did not alter the T cell activation/memory phenotype before or after secondary ConA treatment (Supplementary Fig. 2). Results were similar when we used anti-CD3 and IL-2 for TCR activation, or when CD8⁺ T cells were tested in these conditions (not shown).

Dilution of fluorescence intensity of carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE)-labeled cells after secondary ConA stimulation was greater for *lpr* T cells than for controls (Fig. 1B), indicating that *lpr* T cells undergo a larger number of divisions. This suggests that *lpr* T cell hyperproliferation does not result from normal division of accumulating apoptosis-resistant T cells, but that Fas deficiency confers an intrinsic hyperproliferative effect. To confirm this point, we examined apoptosis-free T cell proliferation systems. In one system, at 48 h after secondary ConA stimulation, live apoptosis-resistant T cells were Ficoll-separated from dead cells and rechallenged with ConA. This consecutive ConA treatment verified the hyperproliferative potential of *lpr* compared to wt T cells in similar apoptosis-free conditions (Fig. 1C). Alternatively, *lpr* T cells hyperproliferated during IL-2-dependent expansion following secondary TCR stimulation in the absence of apoptosis (Fig. 1D). Finally, to study proliferation after secondary TCR challenge in an apoptosis-independent manner, we exposed control and *lpr* T cells to the

caspase inhibitor zVAD. Apoptosis was inhibited, and only *lpr* cells hyperproliferated (Fig. 1E). These data show that Fas/FasL signaling regulates activated T cell proliferation.

T cells exposed to a shortened version of the protocol in Fig. 1A received consecutive ConA and IL-2 treatment (24 h each), followed by secondary ConA stimulation. This led to *lpr* T cell hyperproliferation, which was maintained after zVAD treatment (Fig. 1F). These results exclude the possibility that *lpr* T cell hyperproliferation characterizes a specific T cell type selected by long-term stimulation conditions.

We examined telomere length in wt and *lpr* T cells, since short telomeres can inhibit cell growth; results were similar in both cases (Supplementary Fig. 3A). *lpr* T cells nevertheless showed increased telomerase activity after rechallenge (Supplementary Fig. 3B), concurring with telomerase association with cell cycle regulation¹².

Repeated stimulation of FasL-deficient (*gld*) T cells¹³ showed hyperproliferation analogous to that of *lpr* T cells, indicating that control of T cell proliferation requires Fas/FasL interaction (Fig. 2A). Since FasL has receptor-like signaling activity¹⁴, we tested whether regulation of proliferation was Fas- or FasL-mediated. *gld* (SNARF-labeled) and *lpr* (CFSE-labeled) T cells were co-cultured during secondary ConA challenge. CFSE dilution showed no proliferation differences between *lpr* cells cultured alone or with *gld* T cells, indicating that FasL stimulation of *lpr* T cells by the *gld* cell Fas receptor did not affect cycling (Fig. 2B, top). In a reverse experiment, CFSE-*gld* cells were co-cultured with SNARF-*lpr* cells. CFSE dilution showed that co-cultured *gld* T cells proliferated substantially less than *gld* T cells alone (Fig. 2B, bottom). These data indicate that Fas signaling triggers a T cell proliferation regulatory pathway following FasL interaction.

To confirm that Fas/FasL interaction inhibits *gld*-associated hyperproliferation independently of other cell surface components, we exposed secondary ConA-challenged *gld*

T cells to recombinant FasL. Direct FasL treatment reduced hyperproliferation after rechallenge, which was also evident when apoptosis was inhibited by zVAD (Fig. 2C).

Primary TCR activation and proliferation involves NF- κ B activation¹⁵, which depends on caspase-8 activity¹⁶. We examined whether caspase-dependent NF- κ B activity was required for *lpr* T cell hyperproliferation after secondary ConA treatment. At low concentrations (50 μ M), zVAD inhibited apoptosis in re-challenged wt T cells, but not *lpr* T cell hyperproliferation (Fig. 1E). Hyperproliferation was partially inhibited by 100 μ M zVAD, however, with a marked inhibitory effect at 200 μ M (Fig. 3A, Supplementary Fig. 4A), indicating that hyperproliferation is caspase activity-dependent. zVAD at 200 μ M was not toxic; proliferation was still detected in treated cells (Fig. 3A), but no apoptosis or necrosis (Supplementary Fig. 5). Caspase-8 participates in hyperproliferation, since the zIETD caspase-8-specific inhibitor reduced *lpr* T cell cycling (Supplementary Fig. 4B). The data concur with the role described for caspases in primary T cell activation and proliferation^{8,17,18}.

We analyzed NF- κ B status after secondary TCR challenge and observed NF- κ B hyperactivation and NF- κ B-dependent CD25¹⁹ overexpression in *lpr* compared to wt T cells; both were reduced by zVAD treatment (Fig. 3B, Supplementary Fig. 6A). These results indicate that *lpr* T cell hyperproliferation is controlled by caspase-dependent NF- κ B activity.

To examine whether the anti-proliferative role of Fas is linked to lymphadenopathy development in ALPS patients^{3,4,20}, we analyzed proliferation of rechallenged T cells from type Ia ALPS patients with heterozygous mutations in the Fas death domain. T cells were ConA- or PHA-treated, expanded with IL-2, and rechallenged. Cells from ALPS patients hyperproliferated compared to controls (Fig. 3C), with proliferative differences becoming apparent at 48 h post-rechallenge (Supplementary Fig. 7A). Apoptosis of human control T cells was detected 72 h after secondary stimulation (Supplementary Fig. 7B), indicating that human T cell proliferation is initiated prior to apoptosis. We confirmed a larger number of

divisions for ALPS T cells, since fluorescence dilution of CFSE-labeled cells following secondary stimulation was greater in ALPS than in controls (Fig. 3D). Rechallenge with ConA and IL-2 or plate-bound anti-CD3 yielded similar results (not shown). Overall, the data associate Fas death domain mutations with hyperproliferation of activated T cells. We subsequently examined proliferation of ConA-restimulated T cells from *lpr*^{cg} mice, which bear a point mutation in the death domain²¹. The hyperproliferation profile was comparable for homo- and heterozygous *lpr*^{cg} and *lpr* T cells (Supplementary Fig. 9), confirming that Fas/FasL signaling that controls cell cycle regulation involves the Fas death domain. zVAD treatment (200 μ M) reduced ALPS T cell hyperproliferation (Fig. 3E) and CD25 overexpression (Supplementary Fig. 6B), indicating that hyperproliferation is associated to caspase activation.

We examined the possible effect of NF- κ B activity on cycling control of TCR-rechallenged *lpr* T cells. We found higher cyclin-dependent kinase 2 (Cdk2) activity in *lpr* compared to wt T cells after rechallenge (Fig. 4A), thus linking NF- κ B hyperactivation and T cell hyperproliferation. The expression profile of certain cell cycle-related molecules was similar for *lpr* and wt T cells (Supplementary Fig. 10), although we found differences in the profiles for cell cycle inhibitors p21 and p27. After rechallenge, p21 levels were reduced and p27 was increased in *lpr* cells compared to controls (Fig. 4B). Decreased p21 levels were also found after secondary TCR stimulation following the short stimulation protocol in Fig. 1F (Supplementary Fig. 11A). We detected no differences in p21 levels after primary TCR-dependent stimulation (Supplementary Fig. 11B). zVAD treatment reconstituted p21 levels in rechallenged *lpr* T cells (Fig. 4C), suggesting that caspase-dependent NF- κ B activation leads to decreased p21 expression, contributing to *lpr* T cell hyperproliferation.

We have shown that p21 prevents autoimmunity development and controls homeostasis by inhibiting memory T cell proliferation^{22,23}. p21 overexpression in *lpr* T cells might thus

reduce hyperproliferation and lymphadenopathy. Mice expressing a p21 transgene in T cells (C57BL/6-p21tg) show normal thymic T cell differentiation and peripheral T cell subset representation²⁴. We generated C57BL/6 *lpr*-p21tg mice and observed reduced *in vivo* proliferation of CD4⁺, CD8⁺ and DN T cells (Fig. 4D), which hyperproliferate in *lpr* mouse lymph nodes compared to wt T cells (Supplementary Fig. 12). Secondary *in vitro* TCR challenge led to a reduction in *lpr*-p21tg T cell proliferation compared to *lpr* controls (Supplementary Fig. 13A), accompanied by reduced Cdk2 activity (Supplementary Fig. 13B). Apoptosis was equally deficient in both T cell types (Supplementary Fig. 13C), and also after ConA treatment of 6-day IL-2-expanded cells (not shown), suggesting that the proliferation reduction was apoptosis-independent. Finally, C57BL/6 *lpr*-p21tg mice showed a decrease in DN T cell proportions (Fig. 4E), and a remarkable reduction in lymphadenopathy (Fig. 4F). These results show that *in vivo* inhibition of T cell hyperproliferation by Fas signaling is fundamental for maintenance of homeostasis.

Our findings demonstrate that Fas/FasL interaction activates an antiproliferative pathway of apoptosis-resistant T cells through the Fas death domain; this pathway is essential for homeostasis. Fas signaling leads to inhibition of caspase-dependent NF- κ B activation and of proliferation of apoptosis-resistant T cells. This suggests that Fas limits the proliferative potential of these cells, which would otherwise expand excessively and challenge homeostasis. Indeed, *lpr* mouse and ALPS patient T cells hyperproliferate and accumulate *in vivo*^{4, 25}. We propose a dual role for Fas in activated/memory T cell homeostasis. First, it induces death of apoptosis-susceptible TCR-rechallenged T cells by caspase activation, and second, it reduces the proliferative potential of apoptosis-resistant T cells by inhibiting caspase and NF- κ B activation. The function of Fas as a negative regulator of T cell cycling offers fresh views for homeostasis control and should be considered when designing treatments for diseases caused by disturbances in T cell homeostasis.

Methods Summary

Here we describe the *in vitro* proliferation assays that constitute an important part of the experimental work. Purified mouse T cells ($10^6/\text{ml}$) were stimulated *in vitro* with ConA ($3\text{ }\mu\text{g/ml}$; Sigma) in conditioned medium containing 20 ng/ml recombinant IL-2 (rIL-2, PeproTech), or in conditioned medium with 20 ng/ml rIL-2 in anti-CD3 antibody-coated wells (145.2C11, PharMingen; $1\text{ }\mu\text{g/ml}$ in $100\text{ }\mu\text{l/well}$ PBS).

Proliferation was quantified by [^3H]thymidine uptake ($1\text{ }\mu\text{Ci}/150\text{ }\mu\text{l}$) added in the last 16 h of culture. After 3 days, ConA-stimulated cells were washed and further cultured for 6 days in conditioned medium with 20 ng/ml rIL-2; during this period, cells were subcultured every 3 days. Cells were then restimulated with ConA and IL-2 or on anti-CD3-coated plates. Each ConA stimulation was evaluated in parallel with primary stimulation of wt CD4^+ lymphocytes to confirm stimulation equivalence.

In the short stimulation protocol, purified T cells ($5 \times 10^5/\text{ml}$) were stimulated *in vitro* with ConA ($3\text{ }\mu\text{g/ml}$) in conditioned medium as above. After 24 h, ConA-stimulated cells were washed and cultured for 24 h in conditioned medium with 20 ng/ml rIL-2, followed by ConA and rIL-2 restimulation.

In some cultures, the caspase peptide benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-fluoromethylketone (zVAD) (Bachem) or Z-I-E(OMe)-T-D-(Ome)-fluoromethylketone (zIETD) (Medical & Biological Laboratories, Naka-ku Nagoya, Japan) was added at indicated concentrations. For FasL induction of apoptosis, we used a kit that included soluble recombinant fluoresceinated antigen (Flag)-tagged FasL and a crosslinking enhancer (Alexis Biochemicals).

Methods

Mice

Control C57BL/6 mice were from Harlan Interfauna Ibérica (San Feliu de Codines, Spain); C57BL/6-*lpr* (B6.MRL-*Tnfrsf6lpr*), C57BL/6-*gld* (B6Snm.C3-*Tnfrsf6gld*), CBA-*lpr*^{cg} (CBA/KIJms-*Tnfrsf6lpr-cg*) and CBA/J mice were purchased from Jackson Laboratories. We generated C57BL/6-*lpr*-p21tg mice by crossing C57BL/6-*lpr* with C57BL/6-p21tg mice²⁴. In these mice, p21 expression is under the control of the proximal Lck promoter, restricting transgene expression to the T cell lineage.

Patients

We analyzed the proliferative profile of T cells from three type Ia autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS) patients from two unrelated families. Patients had not received treatment and displayed hypergammaglobulinemia, an increased percentage of double-negative T cells and diverse degree of lymphadenopathy. Patient P-FA carried the Fas mutation G493T (Arg234Leu); patients P-1-FB and P-2-FB bore the Fas mutation T1045C (Leu264Pro). In both families, mutations were heterozygous and located in exon 9 of the Fas gene (TNFRSF6), affecting the Fas protein death domain. Diagnostic and genomic studies were carried out in the Immunology Department, La Paz Hospital (Madrid, Spain) according to standard protocols from the Spanish Ministry of Health.

Cell preparation

Mouse CD4⁺ or CD8⁺ T cells were purified from spleen single-cell suspensions using the Mouse CD4 Negative or Mouse CD8 Negative Isolation Kits (DynaL Biotech), respectively, resulting in a population of >90% pure CD4⁺ or CD8⁺ T cells, as tested by flow cytometry.

Patient T cells were isolated using the MACS Pan T Cell Isolation Kit II human (Miltenyi Biotec). For some experiments, CD4⁺ or CD8⁺ cells were isolated using the CD4⁺ or the

CD8⁺ T Cell Isolation Kits II human (Miltenyi). Similar results were obtained when peripheral blood leukocytes (PBL) were isolated by Ficoll-Hypaque gradient centrifugation.

Cultures and *in vitro* proliferation assays of human T cells

For human T cell cultures, purified T cells (10⁶/ml) were stimulated *in vitro* with phytohemagglutinin (PHA, 2 µg/ml, Roche) or ConA (3 µg/ml), or in anti-CD3 antibody-coated culture wells (1 µg/ml in 100 µl/well PBS). After 3 d, stimulated cells were washed, then cultured for 9 days in conditioned medium with 20 ng/ml rIL-2; during this period, cells were subcultured every 3 days. Cells were then restimulated with ConA and rIL-2, with PHA, or on anti-CD3-coated plates.

Following the IL-2 expansion period after primary ConA stimulation, functional Fas transduction signaling disruption was assessed in *in vitro*-treated T cells from patients and healthy donors using recombinant FasL and crosslinking enhancer (Alexis Biochemicals).

CFSE and SNARF labeling

Cells were incubated with the fluorescent dyes carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester (CFSE, 2.5 µM) or carboxy SNARF (2.5 µM; both from Molecular Probes) in PBS (37°C, 15 min). After stimulation, decay of CFSE fluorescence was measured on gated live propidium iodide (PI)-negative cells.

Flow cytometric analysis

In vivo lymphocyte population composition was determined by triple staining with anti-CD4, -CD8, and -Thy-1 antibodies; stained cells were analyzed on an LSR Becton Dickinson cytometer. For CD25 staining, cells were stained with CD4, CD25 and Foxp3 (to exclude regulatory T cells). All *in vitro*-stained CD4⁺/CD25⁺ cells were Foxp3-negative. Cultured CD4⁺ T cells were phenotyped using anti-CD4, -CD44 and -CD62L antibodies. To estimate apoptosis and cell cycle state, cells were permeabilized and stained using PI (20 µl/ml) and

RNAse (100 μ l/ml). All antibodies were purchased from Pharmingen, except Foxp3 (eBioscience).

***In vivo* BrdU administration**

Mice were given BrdU (0.8 mg/ml; Sigma-Aldrich) in drinking water, prepared freshly every 2 days, for a 9-day period and BrdU expression was determined²⁶. Cells were triple-stained with appropriate combinations of labeled anti-CD4, -CD8 and -Thy-1 antibodies and a FITC-conjugated anti-BrdU antibody (Becton Dickinson).

Telomere length and telomerase determination

Q-FISH was performed as described²⁷ and images captured using Leica Q-FISH software. TFL-Telo software (a gift of Dr. P. Lansdorp, Vancouver, Canada) was used to quantify fluorescence intensity of telomeres from 7-10 metaphases for each data point. Images of metaphases from littermate mice were captured on the same day and scored blind.

S-100 extracts were prepared from cells, and a modified version of the TRAP assay was used to measure telomerase activity²⁸. An internal control for PCR efficiency was included (TRAPeze kit, Oncor Appligene, Heidelberg, Germany). TRAP products were quantified using a Storm PhosphorImager and ImageQuant v.1.2 (both from Molecular Dynamics) or NIH Image v.1.62 software.

Western blot

Cultured cells were centrifuged on a Ficoll density gradient to remove dead cells, washed with PBS and lysed in lysis buffer (1% NP-40, 10 μ g/ml leupeptin, 10 μ g/ml aprotinin, 5 mM NaF, 1 mM PMSF in 50 mM Tris, pH 7.4). Lysates were separated by SDS-PAGE and analyzed in Western blot using anti-p21 (sc-397), -p19 (sc-481), -p16 (sc-1661), and -cyclin E (sc-481) antibodies (all from Santa Cruz Biotechnology), anti-p27 (K0082-3, Medical & Biological Laboratories), anti-cyclin D3 (Pharmingen), -cyclin A (Upstate), -CDK2 (sc-163, Santa Cruz) and - β -actin (Sigma).

EMSA

For gel shift assays, nuclear extracts (6-10 μ g) from Ficoll-separated live cells were incubated with 0.5 ng 32 P-end-labeled double-stranded oligonucleotide probes 5'-AGTTGAG GGGACTTTCCCAGGC-3', which contains NF- κ B binding sites (Promega) and 5'- TCGAC AACCTCATCACCTATTGGCTATAAAATCATAAGG-3', which contains the NF-Y binding site²⁹. The reaction was performed in binding buffer with 1.5 μ g poly (dI-dC), and binding products were resolved by electrophoresis.

Cdk2 activity

For Cdk2 kinase assays, cultured CD4⁺ T cells were washed with PBS and lysed in buffer containing 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM sodium pyrophosphate, 1 mM sodium orthovanadate and 0.5% NP40. Lysates (200 μ g) were incubated with anti-Cdk2 (5 μ g, overnight), and activity was determined as described³⁰.

Statistical analysis

The Student's *t* test was used for all statistical analyses; p values <0.05 were considered significant.

References

1. Nagata, S. & Golstein, P. The Fas death factor. *Science* **267**, 1449-1456 (1995)
2. Walker, L. S. & Abbas, A. K. The enemy within: keeping self-reactive T cells at bay in the periphery. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 11-19 (2002)
3. Bidere, N., Su, H. C. & Lenardo, M. J. Genetic disorders of programmed cell death in the immune system. *Annu Rev Immunol* **24**, 321-352 (2006)
4. Straus, S. E., Sneller, M., Lenardo, M. J., Puck, J. M. & Strober, W. An inherited disorder of lymphocyte apoptosis: the autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Ann Intern Med* **130**, 591-601 (1999)
5. Newton, K., Harris, A. W., Bath, M. L., Smith, K. G. & Strasser, A. A dominant interfering mutant of FADD/MORT1 enhances deletion of autoreactive thymocytes and inhibits proliferation of mature T lymphocytes. *EMBO J* **17**, 706-718 (1998)
6. Zhang, J., Cado, D., Chen, A., Kabra, N. H. & Winoto, A. Fas-mediated apoptosis and activation-induced T-cell proliferation are defective in mice lacking FADD/Mort1. *Nature* **392**, 296-300 (1998)
7. Smith, K. G., Strasser, A. & Vaux, D. L. CrmA expression in T lymphocytes of transgenic mice inhibits CD95 (Fas/APO-1)-transduced apoptosis, but does not cause lymphadenopathy or autoimmune disease. *EMBO J* **15**, 5167-5176 (1996)
8. Chun, H. J. et al. Pleiotropic defects in lymphocyte activation caused by caspase-8 mutations lead to human immunodeficiency. *Nature* **419**, 395-399 (2002)
9. Rathmell, J. C. & Thompson, C. B. Pathways of apoptosis in lymphocyte development, homeostasis, and disease. *Cell* **109** Suppl, S97-107 (2002)
10. Balomenos, D. & Martínez-A., C. Cell-cycle regulation in immunity, tolerance and autoimmunity. *Immunol Today* **21**, 551-555 (2000)

11. Newton, K. & Strasser, A. Caspases signal not only apoptosis but also antigen-induced activation in cells of the immune system. *Genes Dev* **17**, 819-825 (2003)
12. Blasco, M. A. Telomerase beyond telomeres. *Nat Rev Cancer* **2**, 627-633 (2002)
13. Lynch, D. H. et al. The mouse Fas-ligand gene is mutated in gld mice and is part of a TNF family gene cluster. *Immunity* **1**, 131-136 (1994)
14. Newell, M. K. & Desbarats, J. Fas ligand: receptor or ligand? *Apoptosis* **4**, 311-315 (1999)
15. Ruland, J. & Mak, T. W. Transducing signals from antigen receptors to nuclear factor kappaB. *Immunol Rev* **193**, 93-100 (2003)
16. Su, H. et al. Requirement for caspase-8 in NF-kappaB activation by antigen receptor. *Science* **307**, 1465-1468 (2005)
17. Kennedy, N. J., Kataoka, T., Tschopp, J. & Budd, R. C. Caspase activation is required for T cell proliferation. *J Exp Med* **190**, 1891-1896 (1999)
18. Falk, M. et al. Caspase inhibition blocks human T cell proliferation by suppressing appropriate regulation of IL-2, CD25, and cell cycle-associated proteins. *J Immunol* **173**, 5077-5085 (2004)
19. Voll, R. E. et al. NF-kappa B activation by the pre-T cell receptor serves as a selective survival signal in T lymphocyte development. *Immunity* **13**, 677-689 (2000)
20. Rieux-Laucat, F. et al. Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity. *Science* **268**, 1347-1349 (1995)
21. Kimura, M. & Matsuzawa, A. Autoimmunity in mice bearing lprcg: a novel mutant gene. *Int Rev Immunol* **11**, 193-210 (1994)
22. Balomenos, D. et al. The cell cycle inhibitor p21 controls T-cell proliferation and sex-linked lupus development. *Nat Med* **6**, 171-176 (2000)

23. Arias, C. F. et al. p21CIP1/WAF1 Controls Proliferation of Activated/Memory T Cells and Affects Homeostasis and Memory T Cell Responses. *J. Immunol* **178**, 2296-2306 (2007)
24. Fotadar, R. et al. Effect of p21waf1/cip1 transgene on radiation induced apoptosis in T cells. *Oncogene* **18**, 3652-3658 (1999)
25. Balomenos, D., Rumold, R. & Theofilopoulos, A. N. The proliferative in vivo activities of lpr double-negative T cells and the primary role of p59fyn in their activation and expansion. *J. Immunol.* **159**, 2265-2273 (1997)
26. Balomenos, D., Rumold, R. & Theofilopoulos, A. N. Interferon-gamma is required for lupus-like disease and lymphoaccumulation in MRL-lpr mice. *J. Clin. Invest.* **101**, 364-371 (1998)
27. Espejel, S. et al. Mammalian Ku86 mediates chromosomal fusions and apoptosis caused by critically short telomeres. *EMBO J* **21**, 2207-2219 (2002)
28. Blasco, M. A., Rizen, M., Greider, C. W. & Hanahan, D. Differential regulation of telomerase activity and telomerase RNA during multi-stage tumorigenesis. *Nat. Genet.* **12**, 200-204 (1996)
29. Morin, C. L., Schlaepfer, I. R. & Eckel, R. H. Tumor necrosis factor-alpha eliminates binding of NF-Y and an octamer-binding protein to the lipoprotein lipase promoter in 3T3-L1 adipocytes. *J Clin Invest* **95**, 1684-1689 (1995)
30. Collado, M. et al. Inhibition of the phosphoinositide 3-kinase pathway induces a senescence-like arrest mediated by p27Kip1. *J Biol Chem* **275**, 21960-21968 (2000)

Supplementary Information is linked to the online version of the paper at www.nature.com/nature

Acknowledgements. We thank the ALPS patients for their generosity, M.R. Martínez for clinical assistance, and C. Mark for editorial help. ABT receives a predoctoral fellowship from the Community of Madrid regional government (CAM). DB is a Ramón y Cajal fellow of the Spanish Ministry of Education and Science (MEC). This work was supported by grants to DB from the MEC and the CAM. The Department of Immunology and Oncology was founded and is supported by the Spanish National Research Council (CSIC) and by Pfizer.

Author Contributions. M.T. performed the NF- κ B and related assays, A.C. performed telomere and telomerase experiments, M.C.G.R. carried out DNA analysis of patient specimens, and A.B.T did the remaining experimental work. All authors discussed the results and commented on the manuscript.

Author Information. Reprints and permissions information is available at npg.nature.com/reprintsandpermissions. The authors declare no competing financial interests. Correspondence and requests for materials should be addressed to D.B. (dbalomenos@cnb.uam.es).

Legends to the figures

Figure 1. *lpr* mouse T cell hyperproliferation after secondary TCR challenge. (A) CD4⁺ splenocytes were ConA-stimulated for 8 rounds, each followed by a 6-day IL-2-dependent expansion, $n=5$ (representative of 6 experiments). (B) CFSE dilution, of live restimulated CD4⁺ cells (representative of 5 experiments). (C) After 48 h of secondary stimulation, Ficoll-separated CD4⁺ live cells were ConA-stimulated for 24 h. Proliferation (left), PI staining (right). (D) Proliferation after 6 days of IL-2 expansion following primary or secondary ConA stimulation, and PI staining of IL-2-expanded T cells after secondary stimulation. (E) ConA restimulation in the presence of zVAD or control (DMSO). PI staining (24 h post-stimulation) and proliferation. (F) CD4⁺ cell restimulation after 24 h ConA treatment, followed by 24 h IL-2 expansion. Proliferation 48 h after restimulation, alone or with zVAD ($n=4$; $p<0.0006$ and $p<0.0001$, respectively). All values represent mean \pm SD.

Figure 2. Fas-dependent signaling controls cell cycle. (A) Proliferation of *gld* CD4⁺ splenocytes during first and second ConA stimulation and CFSE dilution 72 h post-restimulation. (B) *lpr* and *gld* CD4⁺ cells were co-cultured during restimulation; the two cell types were distinguished using CFSE and SNARF labeling. CFSE dilution of *lpr* cells in single and mixed cultures at 72 h (top) and for CFSE-labeled *gld* T cells, alone or with SNARF-labeled *lpr* cells (bottom). (C) PI staining and proliferation of *gld* CD4⁺ splenocytes 24 h after rechallenge in the presence of zVAD (50 μ M) and recombinant FasL.

Figure 3. *lpr* and ALPS T cell hyperproliferation is caspase-dependent. (A) Proliferation of ConA-rechallenged CD4⁺ T cells treated with zVAD at different concentrations ($n=5$). (B) Nuclear extracts from Ficoll-separated live CD4⁺ T cells, ConA-rechallenged and zVAD-treated (200 μ M), were assayed by EMSA for NF- κ B binding. Binding to an NF-Y probe was used as loading control. (C) Proliferation ($[^3\text{H}]$ thymidine incorporation triplicates) after rechallenge of CD4⁺ T cells from healthy controls (C1, C2, C3) and ALPS patients (P) from

Family (F) A, P-FA and from Family B, P-1-FB, P-2-FB (representative of three experiments, C vs. P; $p < 0.0005$). (D) CFSE dilution of CD4⁺ cells 72 h after rechallenge (representative of two experiments). Proportions represent highly proliferating T cells. (E) Proliferation of PHA-restimulated T cells incubated with zVAD (200 μ M) ($n=3$).

Figure 4. p21 overexpression inhibits *lpr* T cell hyperproliferation and lymphadenopathy. (A) Cdk2 activity and protein expression in live CD4⁺ ConA-restimulated cells. (B) p21 and p27 expression in live ConA-restimulated cells. (C) p21 expression 72 h after ConA restimulation and zVAD treatment of *lpr* CD4⁺ T cells. (D) *In vivo* BrdU incorporation by lymph node T cells from 2-month-old *lpr* and *lpr*-p21tg mice. ($n=4$; $p < 0.0005$ for all cell types). (E) Accumulation of DN T cells in lymph nodes of 3-month-old *lpr* and *lpr*-p21tg mice ($n=4$; $p < 1 \times 10^{-6}$). (F) Cervical lymph nodes from representative 8-month-old *lpr* and *lpr*-p21tg mice. Lymph node weight of 8-month-old *lpr* and *lpr*-p21tg female mice, $n=10$.

Fig. 1

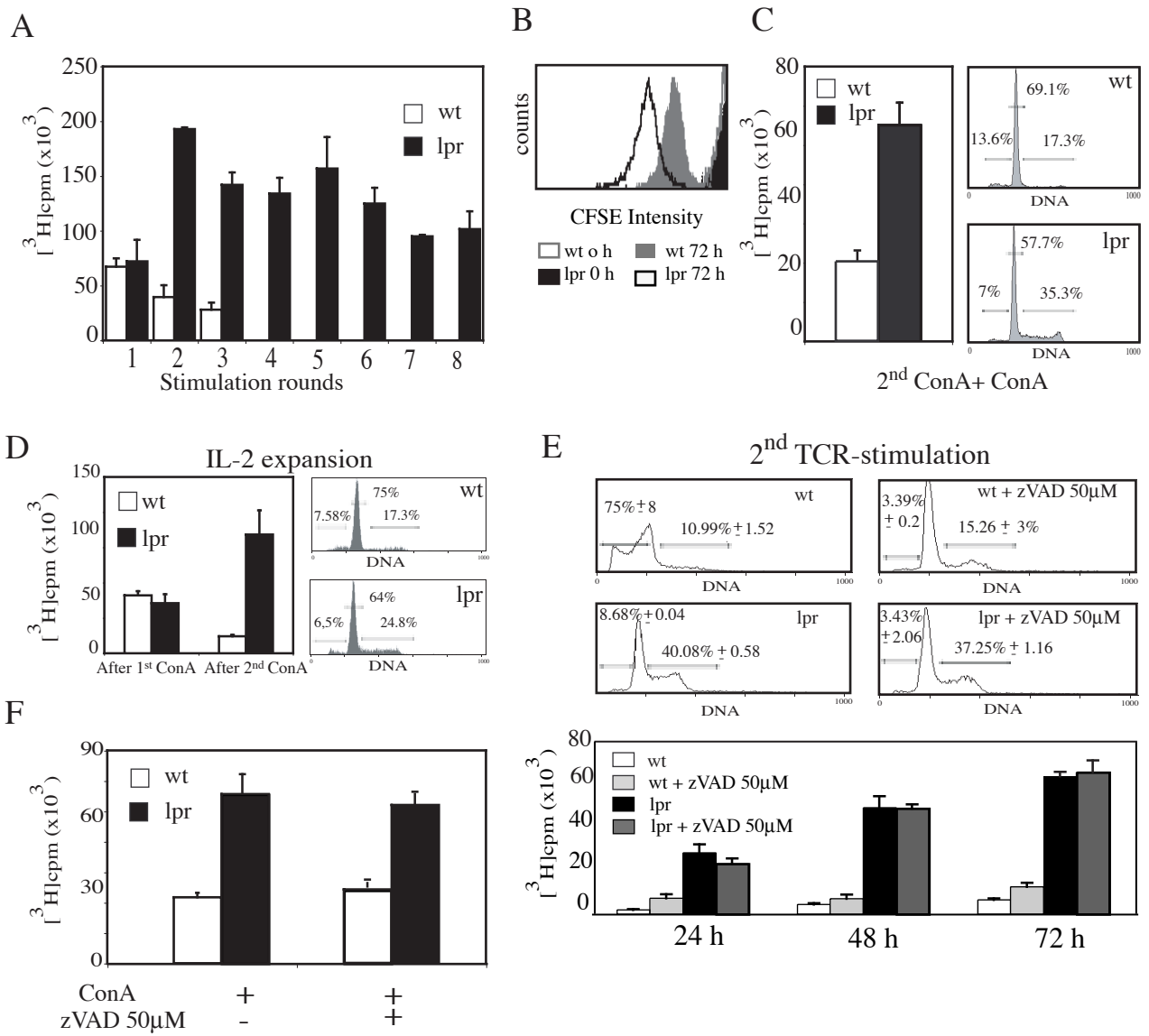


Fig. 2

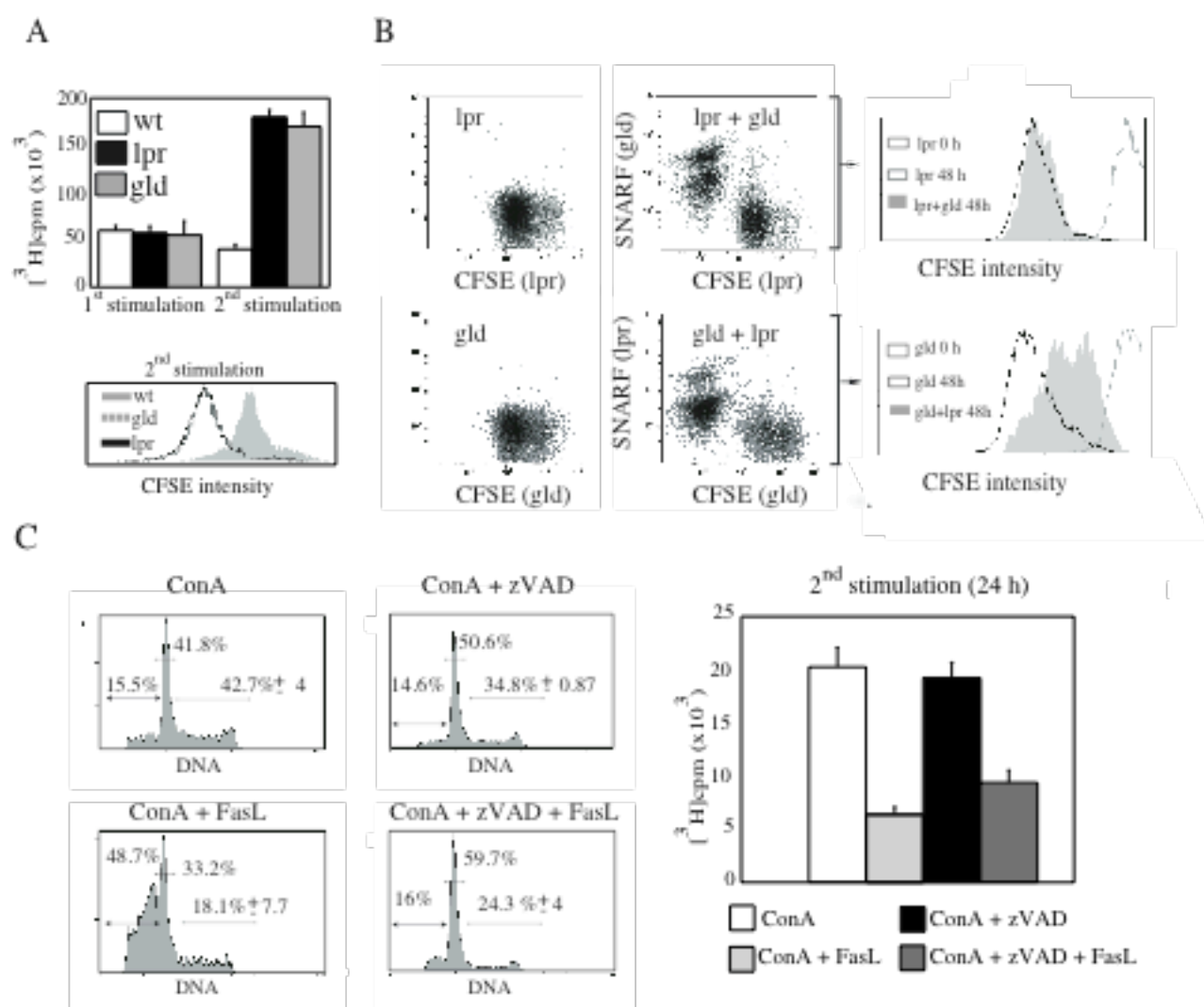


Fig. 3

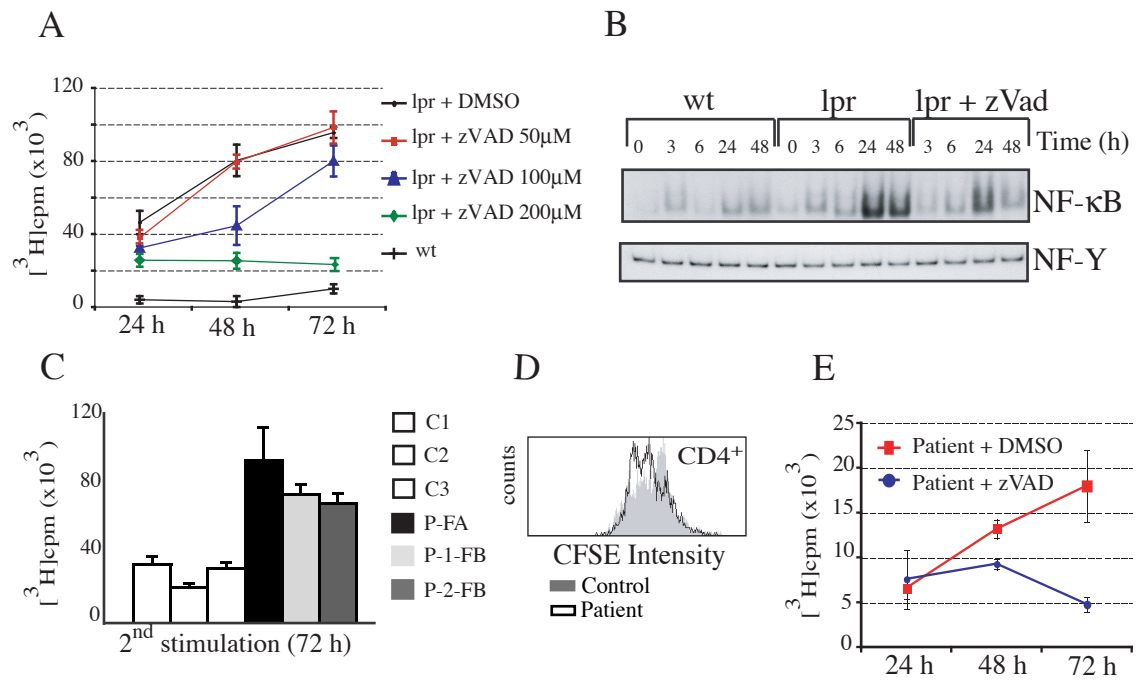
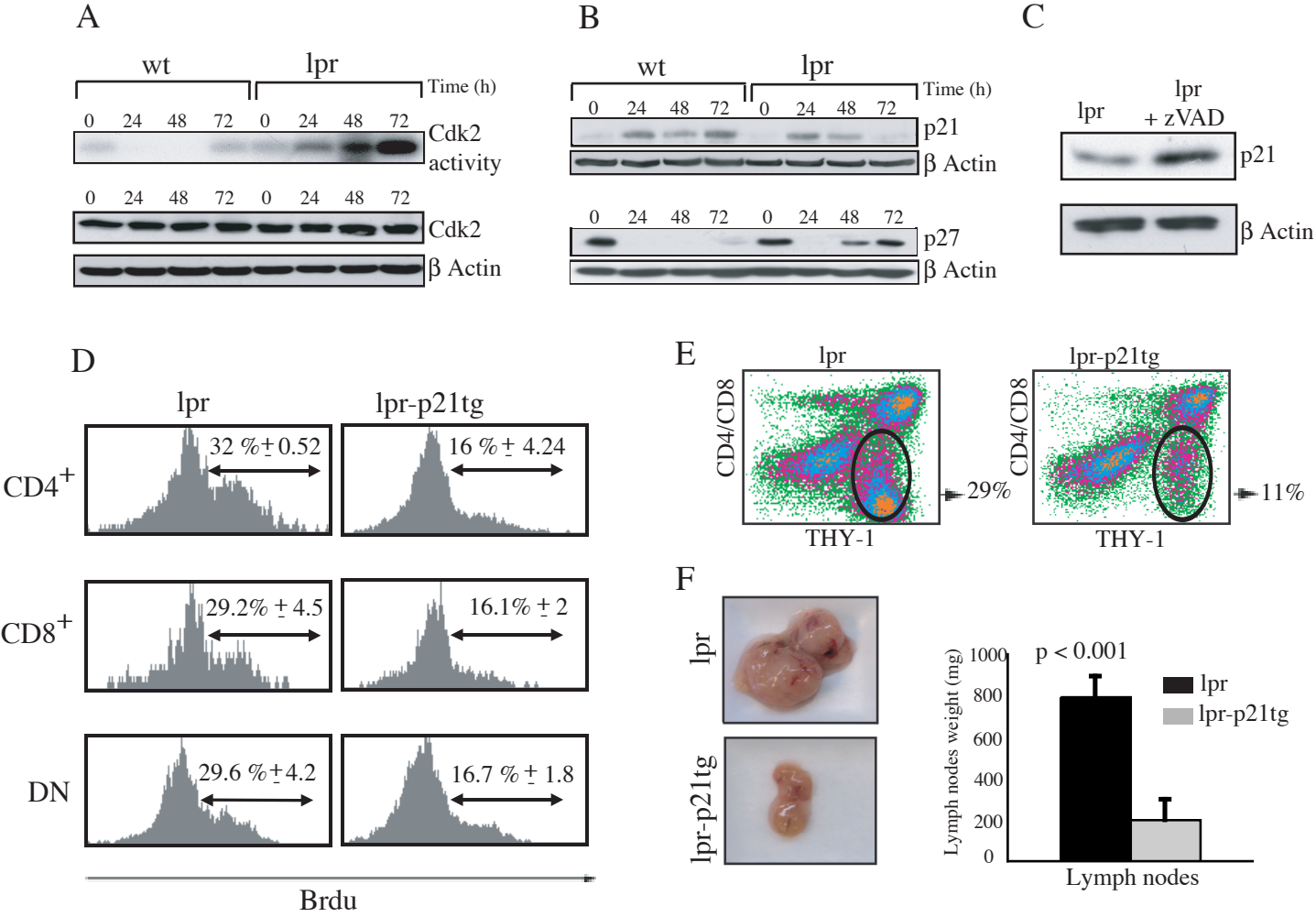


Fig. 4



Supplementary Information

Legends to supplementary figures

Supplementary Fig. 1. Analysis of proliferation and apoptosis from wt and *lpr* CD4⁺ T cells after primary and secondary ConA stimulation. (A) PI staining of wt and *lpr* CD4⁺ splenocytes. Values represent the proportions of apoptotic and cycling cells 24 h after primary and secondary ConA stimulation. (B) ³[H]thymidine incorporation kinetics for wt and *lpr* CD4⁺ splenocytes during primary and secondary ConA stimulation.

Supplementary Fig. 2. Activation status of stimulated CD4⁺ T cells *in vitro*. T cells were triple-stained for CD4, CD44, and CD62L. CD44 and CD62L expression levels in CD4⁺ T cells are shown after IL-2-dependent expansion (left) and 24 h after secondary ConA stimulation following IL-2 expansion (right).

Supplementary Fig. 3. Fas deficiency does not influence telomere length. (A) Telomere length was measured 72 h after secondary ConA stimulation. Histograms show telomere length frequency as determined by Q-FISH. Average length is shown of p arms, q arms, (p+q) arms, and undetectable telomere percentages (free ends). (B) Telomerase activity 72 h after secondary stimulation. Extract concentrations are indicated; (-) untreated or (+) RNase-treated. IC, internal control.

Supplementary Fig. 4. Caspase-dependent hyperproliferation of *lpr* CD4⁺ T cells. (A) Fluorescence intensity dilution, after gating on live PI-negative cells, of CFSE-labeled *lpr* CD4⁺ T cells stimulated alone or in the presence of zVAD (50 or 200 μM). (B) CFSE fluorescence intensity dilution of labeled *lpr* cells, stimulated alone or in the presence of the caspase-8 inhibitor zIETD (200 μM). Histograms show data from cells of representative mice of 4 tested.

Supplementary Fig. 5. Lack of zVAD toxicity on stimulated CD4⁺ T cells. PI staining of *lpr* T cells stimulated alone (top) or in the presence of zVAD (200 μM) (bottom). Values

represent the proportions of apoptotic and cycling cells 24 h after secondary stimulation. Data are representative of one out of four experiments.

Supplementary Fig. 6. zVAD treatment reduces CD25 expression on T cells. (A) CD25 overexpression in *lpr* compared to wt CD4⁺ T cells, 72 h after secondary stimulation (left). zVAD treatment (200 μ M) reduced CD25 overexpression in *lpr* CD4⁺ T cells (right). (B) CD25 expression 72 h after PHA restimulation in CD4⁺ cells from controls and ALPS patients, stimulated alone or in the presence of zVAD (200 μ M).

Supplementary Fig. 7. Proliferation and apoptosis characteristics of ALPS T cells. (A) Kinetics of [³H]thymidine incorporation of MACS-purified CD4⁺ cells from controls and ALPS patients during the second PHA stimulation. (B) PI staining of CD4⁺ T cells at 24, 48 and 72 h after stimulation. Values represent proportions of apoptotic and cycling cells. Data for control C1 and patient P-1-FB are representative of all samples.

Supplementary Fig. 8. Defective Fas/FaL signaling in ALPS patients. MACS-sorted T cells from controls (C1, C2, C3) and patients (P-FA, P-1-FB, P-2-FB) were PHA-stimulated, then expanded in IL-2 for 6 days. Medium was renewed with IL-2 alone or with FasL, and apoptosis was measured after 24 h. Data for control C1 and patient P-1-FB are representative of all samples.

Supplementary Fig. 9. Hyperproliferation in CBA mice bearing an *lpr* death domain point mutation. [³H]thymidine incorporation in CBA, CBA-*lpr*^{cg} homozygote, and CBA-*lpr*^{cg} heterozygote CD4⁺ splenocytes. Values represent mean \pm SD ($n=4$) in one of two independent experiments.

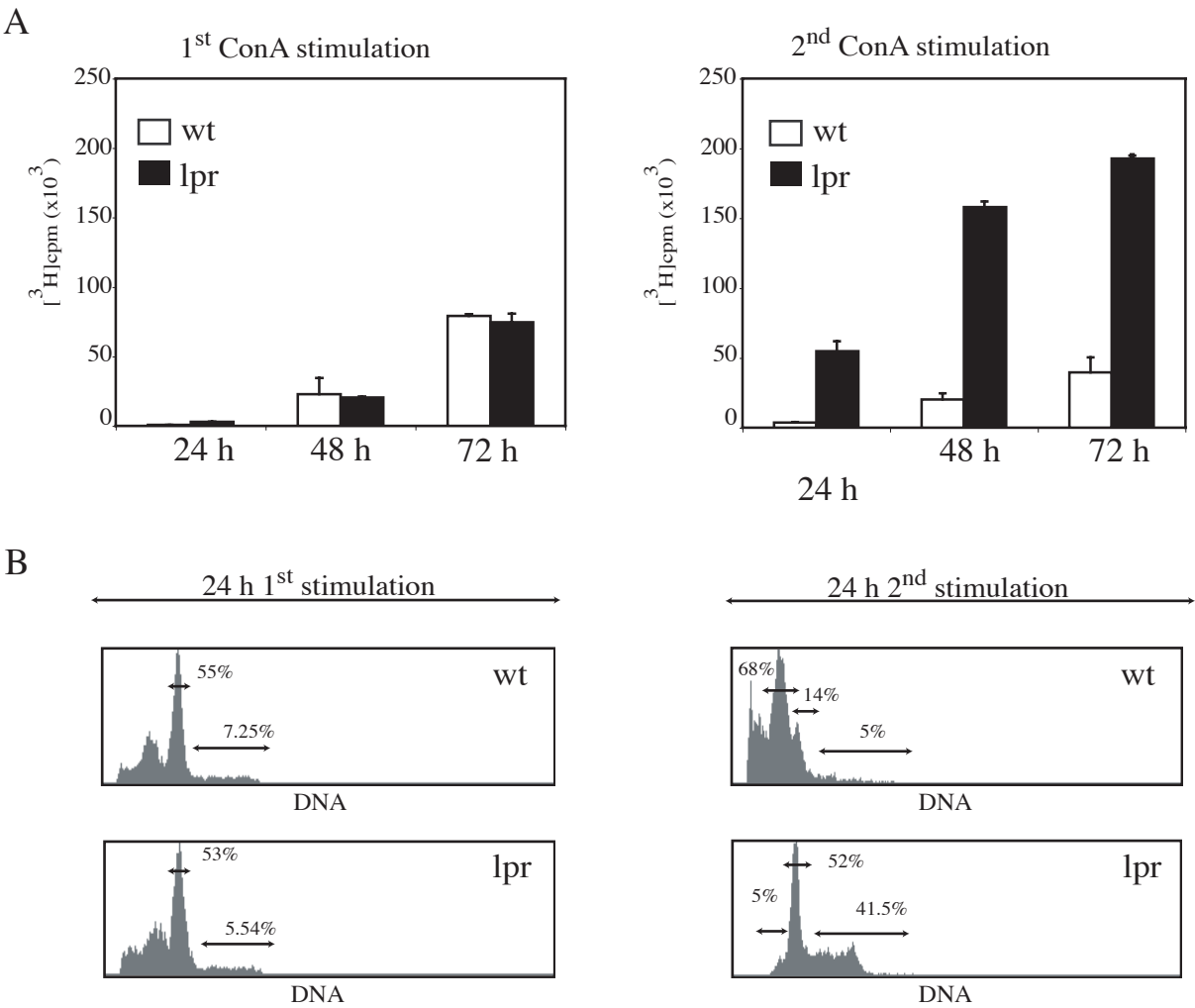
Supplementary Fig. 10. Expression of cell cycle-regulating molecules after secondary T cell stimulation. Western blot analysis showed the expression profile of cyclins and cell cycle inhibitors at 0, 24, 48 and 72 h after secondary ConA stimulation. Lysates were obtained from live CD4⁺ cells, which were Ficoll-separated from apoptotic cells.

Supplementary Fig. 11. p21 expression profile in activated CD4⁺ T cells after primary or secondary stimulation. (A) CD4⁺ T cells were ConA-stimulated for 24 h, followed by 24 h IL-2 expansion and secondary ConA stimulation as in Fig. 1F. p21 expression was assessed in lysates of Ficoll-separated live cells at indicated times after secondary ConA stimulation. (B) Primary ConA-stimulated wt and *lpr* CD4⁺ T cells were harvested at indicated times and p21 expression determined in Western blot.

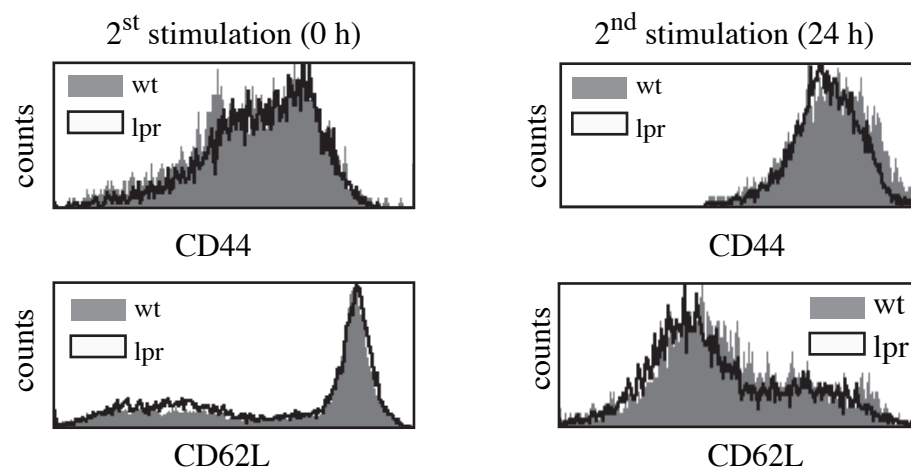
Supplementary Fig. 12. Fas-deficient T cells hyperproliferate *in vivo*. *In vivo* BrdU incorporation by lymph node CD4⁺ and CD8⁺ T cells, and DN T cells from 2-month-old wt and *lpr* mice. Histograms from representative mice are shown; values are mean \pm SD ($n = 4$; for all T cell types p values were at least <0.0001).

Supplementary Fig. 13. Reduced proliferation of *lpr* CD4⁺ T cells expressing a p21 transgene. (A) [³H]thymidine uptake 48 h after secondary ConA challenge of wt CD4⁺ T cells ($n = 5$; $p < 0.00008$ for , *lpr* and *lpr*-p21tg). Cells were previously ConA-stimulated for 24 h, followed by 24 h IL-2 expansion. (B) Cdk2 activity in wt, *lpr* and *lpr*-p21tg CD4⁺ T cells 48 h after secondary stimulation. Total Cdk2 protein expression was confirmed by Western blot. (C) PI staining of *lpr* and *lpr*-p21tg CD4⁺ T cells 24 h after secondary stimulation. Values represent apoptotic and cycling cells of one of 5 experiments.

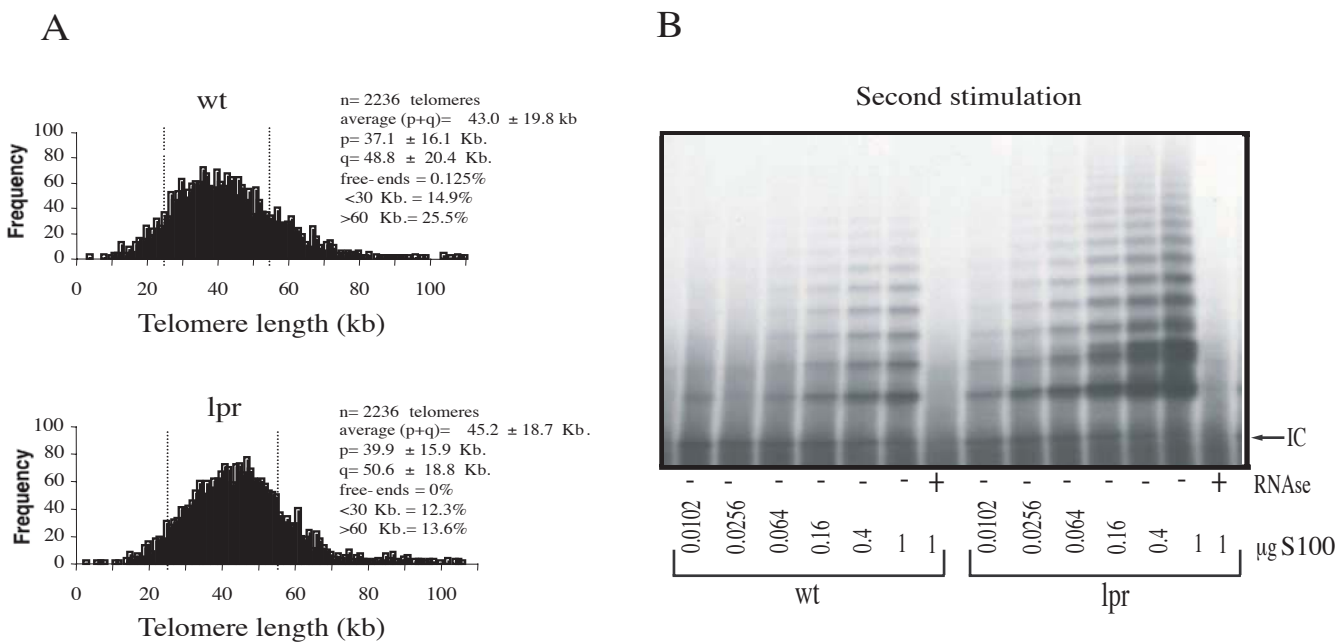
Supplementary Fig.1



Supplementary Fig. 2

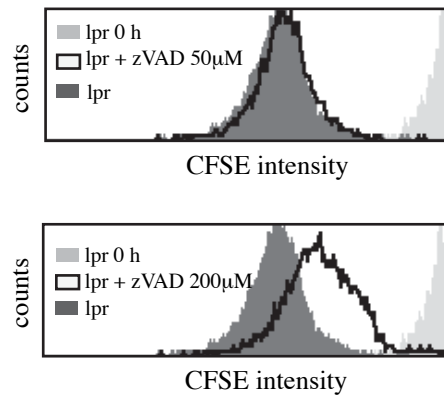


Supplementary Fig. 3

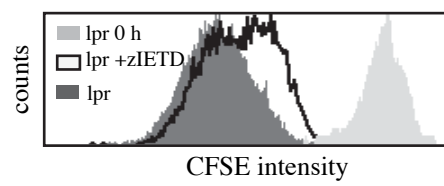


Supplementary Fig. 4

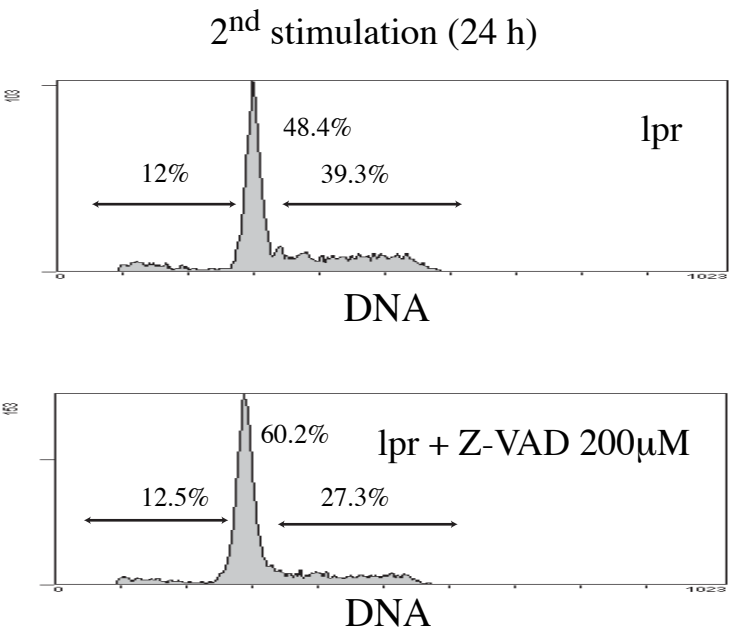
A



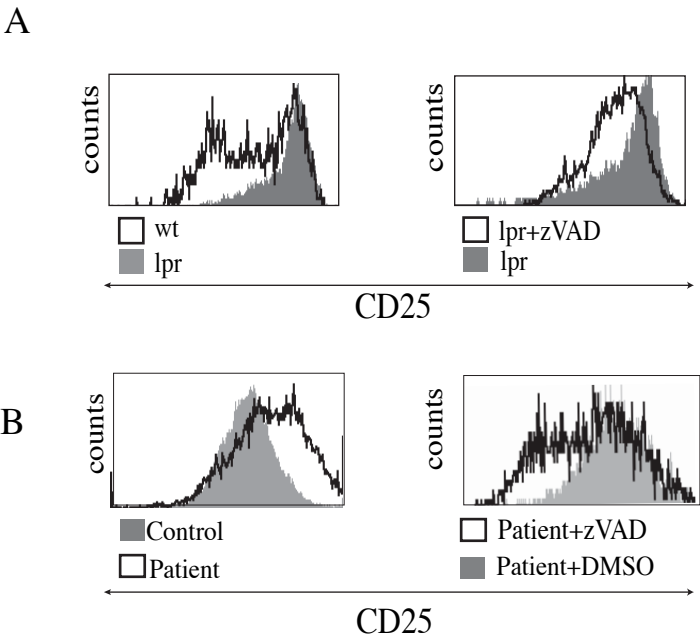
B



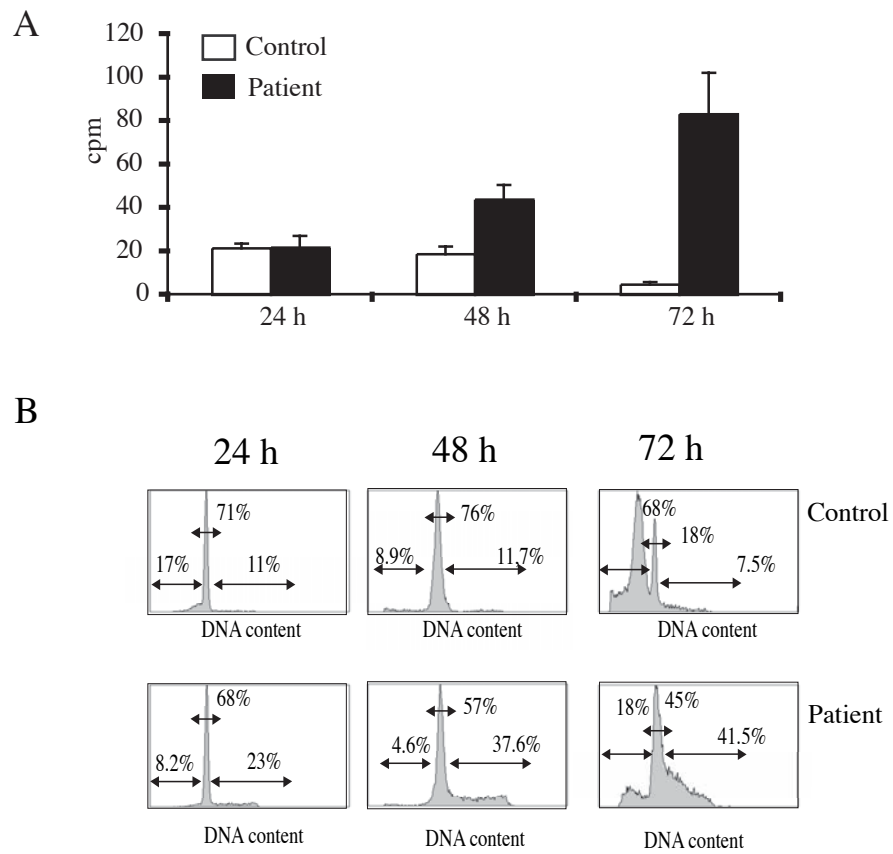
Supplementary Fig. 5



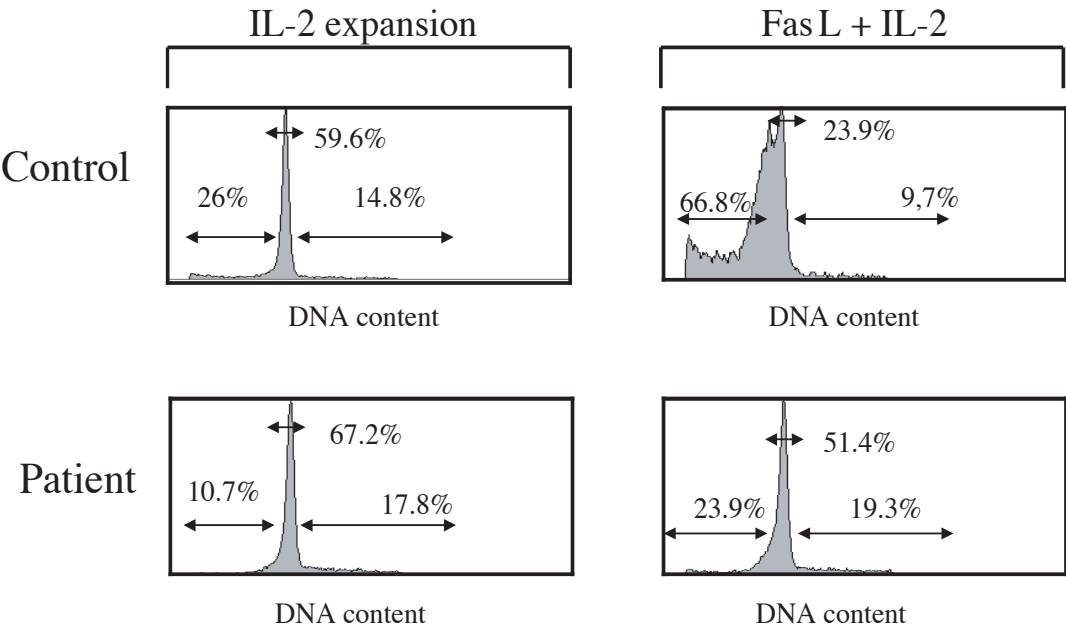
Supplementary Fig. 6



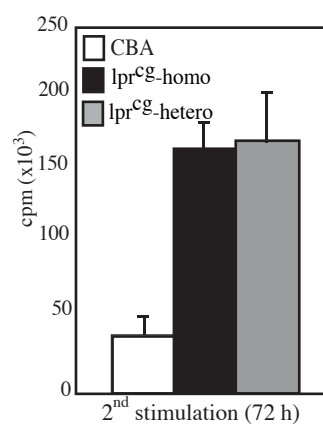
Supplementary Fig. 7



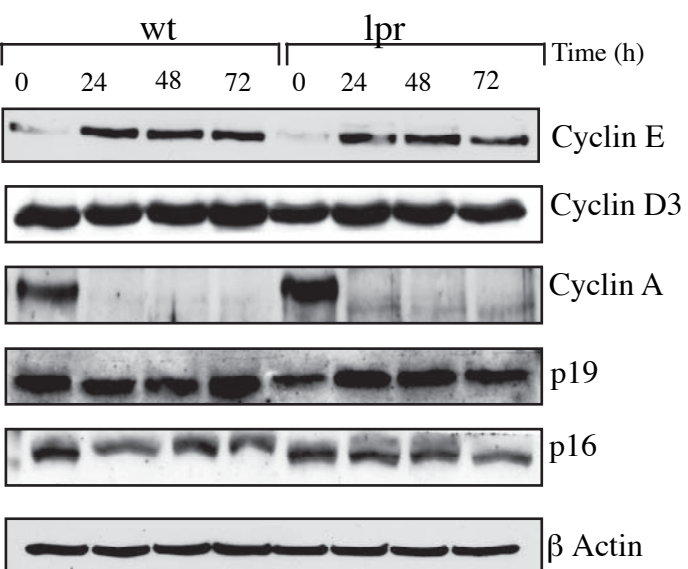
Supplementary Fig. 8



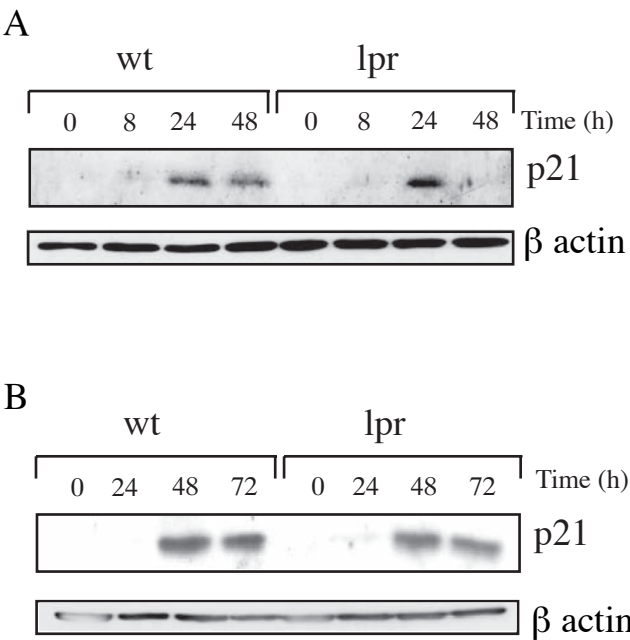
Supplementary Fig. 9



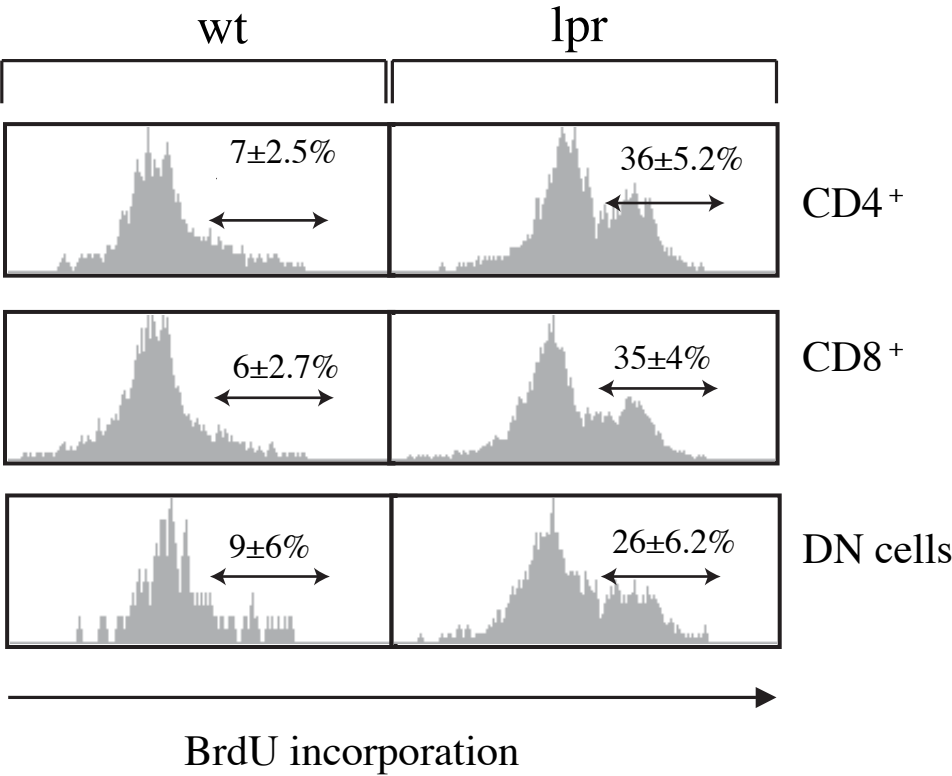
Supplementary Fig. 10



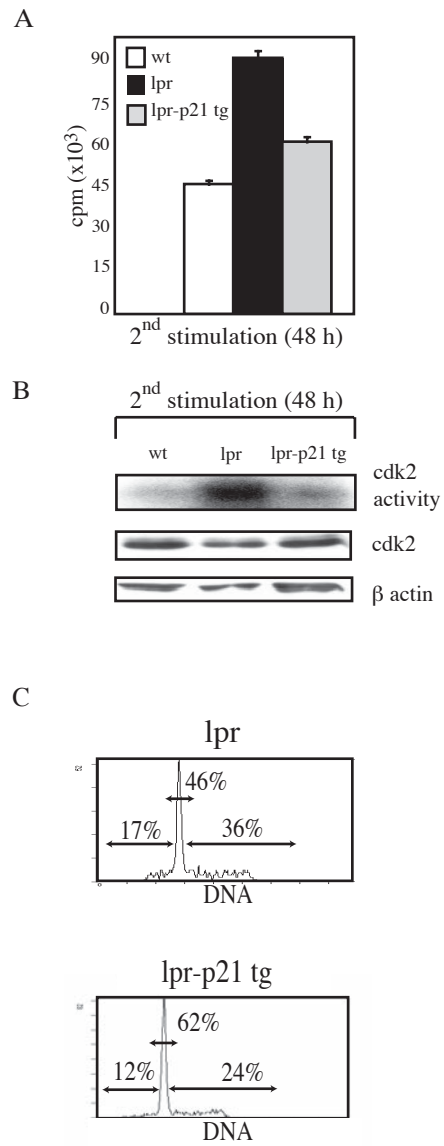
Supplementary Fig. 11



Supplementary Fig. 12



Supplementary Fig. 13



p21^{CIP1/WAF1} Controls Proliferation of Activated/Memory T Cells and Affects Homeostasis and Memory T Cell Responses¹

Cristina F. Arias,* André Ballesteros-Tato,* María Isabel García,* Juan Martín-Caballero,† Juana M. Flores,‡ Carlos Martínez-A,* and Dimitrios Balomenos^{2*}

Development of autoantibodies and lupus-like autoimmunity by 129/Sv × C57BL/6 p21^{-/-} mice has established that cell cycle deregulation is one of the defective pathways leading to break of tolerance. Memory T cell accumulation is thought to be related to tolerance loss in murine lupus models. We studied T cell memory responses in C57BL/6 p21^{-/-} mice that develop lupus-like disease manifestations. p21 did not affect primary proliferation of naive T cells, and was required for cycling control, but not for apoptosis of activated/memory T cells. When we induced apoptosis by secondary TCR challenge, surviving memory T cells depended on p21 for proliferation control. Under conditions of secondary T cell stimulation that did not cause apoptosis, p21 was also needed for regulation of activated/memory T cell expansion. The requirement for p21 in the control of T cell proliferation of activated/memory T cells suggests that in addition to apoptosis, cycling regulation by p21 constitutes a new pathway for T cell homeostasis. Concurring with this view, we found accumulation in p21^{-/-} mice of memory CD4⁺ T cells that showed increased proliferative potential after TCR stimulation. Furthermore, OVA immunization of p21^{-/-} mice generated hyperresponsive OVA-specific T cells. Overall, the data show that p21 controls the proliferation of only activated/memory T cells, and suggest that p21 forms part of the memory T cell homeostasis mechanism, contributing to maintenance of tolerance. *The Journal of Immunology*, 2007, 178: 2296–2306.

One of the Cip/Kip family inhibitors is p21, best known for its role in cell cycle inhibition. It regulates early G₁-S transition by inhibiting cyclin-dependent kinases in complex with cyclins A and E or D (1). Although p21 deletion was predicted to lead to tumor development, it did not lead to spontaneous cancer in young mice (2, 3). The most striking phenotypic property conferred by p21 deficiency is severe lupus-like autoimmunity, glomerulonephritis, and death in mostly female 8- to 11-mo-old mixed background (129/Sv × C57BL/6), leading to death (4). To limit genetic background variances, all studied mice were derived from limited crosses of three breeding pairs (4). Nevertheless, given the multifactorial nature of lupus-like disease (5), we considered that a mixed background may enhance the autoimmunity effect conferred by p21 deficiency (4). It is now well established that hybrid (129/Sv × C57BL/6)F₁ or F₂ mice develop

mostly humoral autoimmunity due to epistatic interactions between the 129/Sv and the C57BL/6 genome (6). Because the mixed background p21^{-/-} mice exhibited dramatically enhanced symptoms of lupus, including lethal glomerulonephritis (4), in comparison with the established mild autoreactivity of 129/Sv × C57BL/6 mice (6), p21 deficiency appears as an essential autoimmunity enhancer.

Mixed background p21^{-/-} mice (derived from an unspecified number of intercrosses) were analyzed in another study (7). p21 deficiency enhanced humoral responses, whereas glomerulonephritis development was mild and was not associated with gender differences. The authors of this work considered p21 deficiency as a minor autoimmunity player (7). An explanation for the results of this study could be that extensive intercrosses between mixed background p21^{-/-} mice led to background heterogeneity and an eventual loss of autoimmunity-enhancing elements that are needed for severe autoimmunity in the absence of p21.

Further support for the role of p21 as a key autoimmunity enhancer was provided by the laboratory of A. Fornace Jr. (Harvard School of Public Health, Boston, MA), showing that p21 deficiency led to severe gender-linked autoimmunity and death (8). Furthermore, this group demonstrated that, introducing the p21 deletion to Gadd45a-deficient mice, which are also autoimmunity predisposed, dramatically increased autoimmunity and mortality in the doubly deficient mice (8). Therefore, the combination of the p21 deletion with certain elements of the 129/Sv × C57BL/6 background (4, 8) or the Gadd45a deletion (8) reveals that p21 deficiency may result in the induction of severe autoimmunity. p21 deficiency thus emerges as an autoimmunity accelerator that is background dependent, as are other principal autoimmunity accelerators, including the *lpr* or the *Yaa* genes (9).

In addition to the above studies, BXSb p21^{-/-} mice were generated, and it was reported that p21 deficiency did not affect the mild autoimmunity that characterizes BXSb female mice (10). On the basis of this work, the authors concluded that deletion of p21 is unrelated to autoimmunity induction and claimed that previous

*Department of Immunology and Oncology, Centro Nacional de Biotecnología/Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Campus de Cantoblanco, Madrid, Spain; †Unidad de Animal de Laboratorio, Barcelona Biomedical Research Park, Barcelona, Spain; and ‡Departamento de Medicina y Cirugía, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

Received for publication September 13, 2006. Accepted for publication November 22, 2006.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked advertisement in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ This work was supported by grants to D.B. from the Spanish Ministry of Education and Science (SAF2002-01973 and SAF2005-05264) and the Community of Madrid (07B/0043/2002). Department of Immunology and Oncology was founded and is supported by the Spanish National Research Council (Consejo Superior de Investigaciones Científicas) and by Pfizer. C.F.A. and A.B.-T. received predoctoral fellowships from the Community of Madrid regional government. D.B. is a Ramón y Cajal fellow of the Spanish Ministry of Education and Science.

² Address correspondence and reprint requests to Dr. Dimitrios Balomenos, Department of Immunology and Oncology, Centro Nacional de Biotecnología/Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Darwin 3, Campus de Cantoblanco, E-28049 Madrid, Spain. E-mail address: dbalomenos@cnb.uam.es

Copyright © 2007 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/07/\$2.00

data showing an autoimmune predisposition in $p21^{-/-}$ mice could be confounded by the autoimmunity predisposition of mixed background mice (10). There are several arguments against this consideration. First, the possibility that the mixed background can confound the effect of a deleted gene has been considered for genes encoded on the distal region of chromosome 1 or on chromosome 7, because interaction of 129 intervals on distal chromosome 1 or on chromosome 7 with the C57BL/6 genome leads to autoantibody production (6). This possibility is discarded due to the localization of p21 on chromosome 17. Second, the lethal autoimmunity effects of $p21^{-/-}$ mixed background mice (4, 8) are much more severe than the autoantibody production by mixed background mice (6). Finally, we have commented previously on the possible complications associated with the multifactorial nature of autoimmune disease (11). Distinct genetic defects can lead to autoimmune disease, and epistatic events between susceptibility loci may confuse the relevance of susceptibility loci (12). Therefore, the fact that p21 deficiency does not accelerate female BXSB autoimmunity could simply indicate that the BXSB background lacks the susceptibility alleles that could interact with the p21 deletion. Alternatively, however, a specific locus of the BXSB background may have a suppressive effect on the p21 deficiency-related events that would be otherwise sufficient for disease development.

In a related experiment with BXSB male mice that carry the *Yaa* gene, the same authors reported that $p21^{-/-}$ BXSB male mice developed reduced autoimmunity (13). Because p21 deficiency did not affect female BXSB disease, the reduced disease of $p21^{-/-}$ BXSB male mice appears to be the result of an interesting interaction between the *Yaa* gene or its effects and p21 deletion. On the basis of this disease reduction in $p21^{-/-}$ BXSB male mice, it was proposed that blocking cell cycle inhibitor activity could be considered a way to treat autoimmunity. This proposal, made on the basis of the effect of the p21 deficiency on the *Yaa* gender-dependent BXSB autoimmunity model (13) and without considering the severe lupus development by p21-deficient mice in conjunction with the Gadd45a deletion or with the 129Sv \times C57BL/6 background (4, 8), could be misleading. Indeed, in agreement with the view that p21 deficiency is indeed an autoimmunity inducer, it was shown recently that the inhibitory effect of p21 on cell cycle has a therapeutic effect on lupus disease in (New Zealand Black \times New Zealand White) F_1 mice (14), providing evidence for a suppressor effect of p21 in lupus autoimmunity. Finally, our approach in the present study was to introduce the p21 deletion on the autoimmunity-free C57BL/6 background with the intention of clarifying any doubts about the role of p21 in autoreactivity induction.

TCR-dependent stimulation of naive T cells leads to their activation and proliferation, followed by homeostasis and memory T cell generation (15, 16). Homeostasis regulates total lymphocyte number, the proportion of naive and memory T cells, and the extent of T cell memory expansion. Homeostasis is based on the balance between growth and death of immune cells (17); apoptosis defects could thus lead to defective homeostasis and T cell accumulation, causing break of tolerance (17, 18). Deregulation of the T cell cycle by lack of p21 leads to tolerance loss (4, 7, 8). Association of T cell tolerance and cell cycle regulation was verified in mice deficient in other cell cycle-associated molecules such as the p53 effector gene Gadd45a (8) and E2F2 (19). These data confirmed our hypothesis that, in addition to apoptotic defects, deficient cell cycle control could be determinant for loss of tolerance and autoimmunity development (20). T cell proliferation anomalies were also shown to be associated to diabetes development (21, 22).

In addition to its cell cycle regulatory role, p21 is proposed to act as an apoptosis regulator (23). The effect of p21 deficiency on

apoptosis is debated, however; some studies report that p21 may inhibit apoptosis (13, 24), whereas others indicate that p21 promotes apoptosis (25, 26). These contrasting views might be explained by considering that the p21 effect on apoptosis may be cell type dependent.

Studies of naive T cells from three different studies (4, 8, 27) show that p21 deficiency does not influence primary TCR-dependent responses. In contrast, another study argued that $p21^{-/-}$ lymph node (LN)³ T cells proliferate more than wild-type (wt) controls after primary T cell proliferation (7). In this work, however, instead of stimulating naive T cells, usually obtained from 8-wk-old mice, LN T cells from 4- to 6-mo-old T cells that presumably contain a rather elevated proportion of memory T cells were TCR stimulated. Therefore, the increased proliferation of post-TCR-challenged p21-deficient T cells may simply represent elevated responses in memory T cells and not enhanced primary cycling of naive T cells.

T cell proliferation during the initial IL-2 expansion phase after primary T cell activation is unaffected by p21 deficiency (4, 27). We nonetheless established that p21 is required for T cell proliferation during the late IL-2 expansion phase (4). Treatment with a p21 peptidyl mimic inhibits expansion of activated lymphocytes from lupus-prone (New Zealand Black \times New Zealand White) F_1 mice (14). These findings suggest that p21 control of cycling may depend on T cell activation status. Other studies showed inhibition of T cell proliferation after transfection with p21 (28) or direct uptake of recombinant p21 protein (29), although T cell status is not discussed.

We explored the association between p21-dependent regulation of T cell proliferation and the activation and/or differentiation status of cycling T cells. We generated $p21^{-/-}$ C57BL/6 mice to minimize genetic background interference in the interpretation of results. Our data showed a critical role for p21 in regulating proliferation of TCR-stimulated activated/memory T cells. p21 did not affect Fas/Fas ligand (FasL)-mediated apoptosis, but governed cycling of apoptosis-resistant memory T cells; p21 may thus control homeostasis by regulating activated/memory T cell proliferation. Finally, general and specific T cell memory responses were increased in $p21^{-/-}$ mice. Overall, our study shows that p21 cycling regulates activated/memory T cell proliferation, which is reflected in p21-dependent memory T cell responses in mice.

Materials and Methods

Mice

Mice were kept in our animal facility under pathogen-free conditions. C57BL/6 mice were obtained from The Jackson Laboratory. Hybrid 129/Sv \times C57BL/6 $p21^{-/-}$ mice were backcrossed to the C57BL/6 background for eight generations, and C57BL/6 $p21^{-/-}$ mice were obtained by intercrossing. C57BL/6 F8 $p21^{-/-}$ breeders were analyzed for 80 microsatellite markers (low-density analysis) (30), and showed >99% identity to the C57BL/6 background. Segments of chromosome 1 from a 129 mouse interact with components of the C57BL/6 background, giving rise to spontaneous mild autoimmune manifestations (6). High-density marker analysis of chromosome 1 (15 markers) confirmed that our $p21^{-/-}$ mice were of C57BL/6 origin (data not shown). The other disease-related locus linked to the 129 background was identified on the chromosome 7 15- to 26.5-cM region (6); analysis of this segment (5 markers) in our $p21^{-/-}$ mice verified their C57BL/6 origin (data not shown). Our institutional review committee reviewed and approved all mouse studies.

Tissue culture and assays

CD4⁺ and CD8⁺ cells were purified from spleen by negative selection using pan-B220 and anti-CD8 or anti-CD4 Dynabeads, respectively (DynaL Biotech), and showed >90% purity. CD4⁺ cells (10^6 /ml) were Con A

³ Abbreviations used in this paper: LN, lymph node; AICD, activation-induced cell death; FasL, Fas ligand; PI, propidium iodide; wt, wild type.

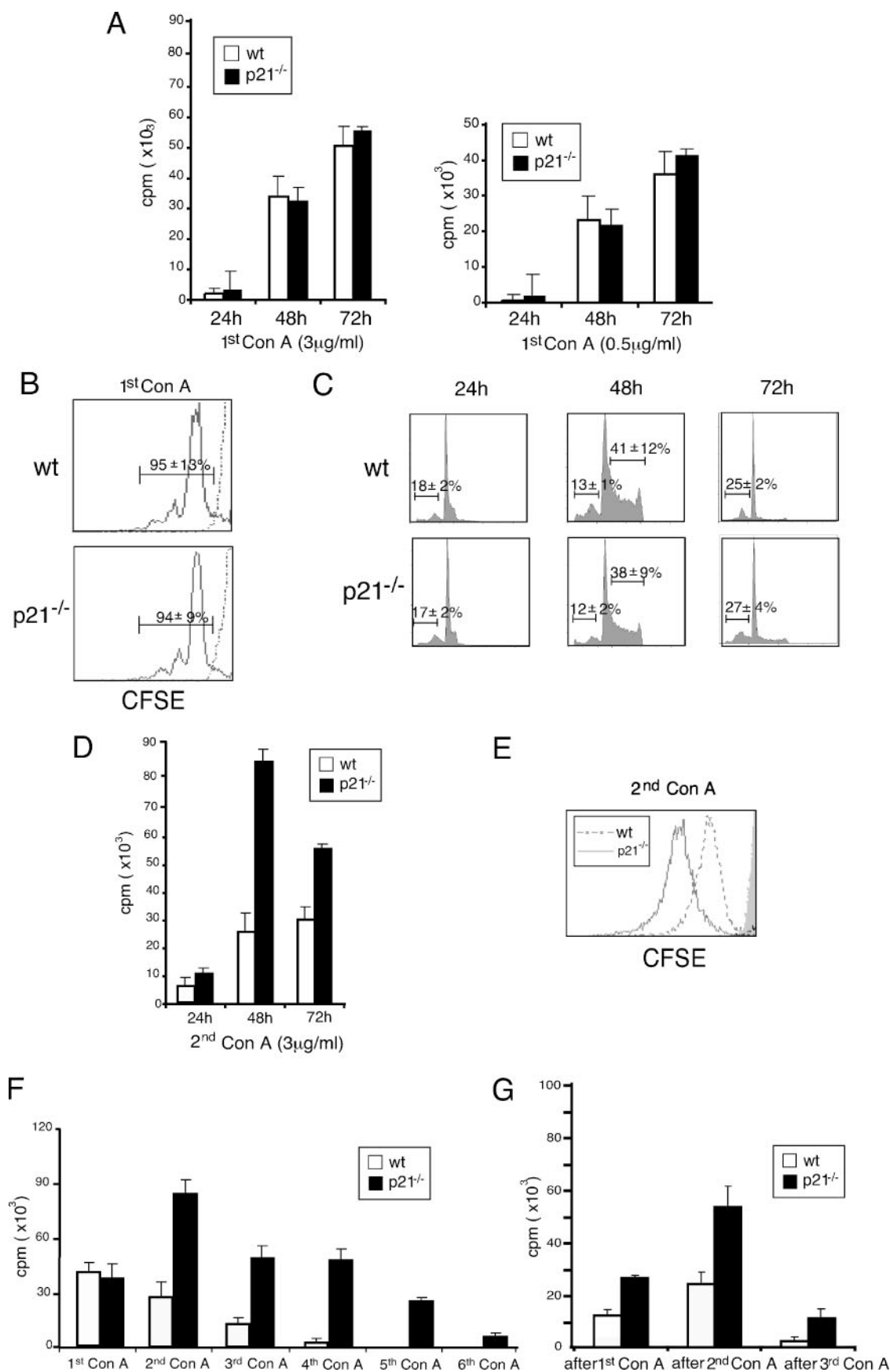


FIGURE 1. Increased proliferative responses of p21^{-/-} T cells. **A**, CD4⁺ splenocytes were stimulated with Con A at 3 or 0.3 μ g/ml, and proliferation kinetics were determined by [³H]thymidine incorporation. Values represent mean \pm SD ($n = 5$). **B**, Dilution of fluorescence intensity in CFSE-labeled (live gated, PI-negative) CD4⁺ T cells was evaluated by FACS analysis 72 h after primary (3 μ g/ml) Con A stimulation. Solid lines represent CFSE dilution after stimulation, whereas broken lines represent fluorescence of CFSE-labeled, but not stimulated cells. Values represent the proportion of proliferating

stimulated for 3 days (3 or 0.5 $\mu\text{g/ml}$; Sigma-Aldrich) in medium containing 10% IL-2. [^3H]Thymidine (1 $\mu\text{Ci}/100\ \mu\text{l}$) was added for the last 16 h of culture, and proliferation was measured. Anti-CD3 (BD Pharmingen) stimulations were also performed with 5 or 0.5 $\mu\text{g/ml}$. Con A-stimulated cells were washed and recultured in 10% IL-2 supernatant (6 days); cells were subcultured in fresh medium every 3 days. In the final IL-2 culture period, cells were restimulated with Con A. IL-2-treated cells were also restimulated in anti-CD3-coated plates (1 $\mu\text{g/well}$) with 10% IL-2, or with soluble anti-CD3 (1 $\mu\text{g/ml}$) and anti-CD28 Ab (0.5 $\mu\text{g/ml}$; both from BD Pharmingen); these anti-CD3 and anti-CD28 concentrations were also used for primary T cell stimulation. Caspase peptide benzoyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp (zVAD)-fmk was added to some cultures (100 μM final concentration) to inhibit apoptosis. Sorted $\text{CD4}^+\text{CD44}^{\text{high}}\text{CD62L}^{\text{low}}$ cells were Con A stimulated (3 $\mu\text{g/ml}$, 72 h) and tested for proliferation, as above.

CD4^+ T splenocytes from OVA (Sigma-Aldrich)-injected mice were purified using Dynabeads, as above, and OVA stimulated *in vitro* (100 $\mu\text{g/ml}$; 10^5 cells/ml; 24 h) in RPMI 1640 containing 10% FCS with irradiated splenocytes ($0.5 \times 10^6/\text{ml}$). Proliferation was measured using [^3H]thymidine, as above.

For apoptosis induction, IL-2-expanded CD4^+ cells were treated in anti-CD3-coated plates (10 $\mu\text{g/well}$) or with the soluble human rFasL kit (500 ng/ml; ALX-850-014; Alexis).

Flow cytometry

CD4^+ and CD8^+ T cells were phenotyped by anti-CD4, anti-CD8, anti-CD44, and anti-CD62L Ab staining (all from BD Pharmingen); stained cells were analyzed on an LSR cytometer (BD Biosciences). For thymocyte analysis, anti-CD4 and anti-CD8 Abs were used. Cell cycle was analyzed by propidium iodide (PI) staining (20 $\mu\text{l/ml}$). Apoptosis levels were measured by TUNEL (Beckman Coulter). For proliferation analysis, cells were incubated with CFSE (2.5 μM ; Molecular Probes) in PBS (37°C, 10 min), followed by 1-min incubation with 1:5 (v/v) FCS. Cells were washed twice with RPMI 1640/5% FCS. Cell surface protein expression and CFSE staining were monitored by flow cytometry and analyzed using the manufacturer's software.

In vivo BrdU administration

Mice were given BrdU (0.8 mg/ml; Sigma-Aldrich) in drinking water, prepared freshly every 2 days, for a 9-day period. BrdU expression was determined after triple staining, as described (21), using appropriate Abs and a FITC-conjugated anti-BrdU Ab (BD Biosciences).

Western blot

Cells were washed with PBS and treated with lysis buffer (1% Nonidet P-40, 10 $\mu\text{g/ml}$ leupeptin, 10 $\mu\text{g/ml}$ aprotinin, 5 mM NaF, 1 mM PMSF in 50 mM Tris (pH 7.4)). Lysates were resolved in 12% SDS-PAGE and analyzed by Western blot using an anti-p21 Ab (Santa Cruz Biotechnology).

Histological and serological analysis

Histological examination of kidneys was done in a blind manner; glomerulonephritis severity was evaluated on H&E-stained paraffin sections using a 0–4 $^+$ scale (31). For immunohistochemistry, 6- μm frozen kidney sections were processed (31) and stained with FITC goat anti-mouse IgG (Southern Biotechnology Associates). Anti-DNA IgG isotypes and anti-OVA Ab were detected by ELISA. IgG isotype reactivity was normalized for equivalent OD against a myeloma isotype control (31) (Caltag Laboratories).

Statistics

The Mann-Whitney *U* test was used for all statistical analyses; *p* values <0.05 were considered significant.

Results

p21-dependent regulation of proliferation in repeatedly TCR-challenged T cells

To examine the role of p21 in the cycling regulation of activation/memory T cells, we used a procedure of repeated TCR stimulations separated by IL-2-dependent expansions, a protocol used to study apoptosis induction and generation of memory T cells. Naive CD4^+ $\text{p21}^{-/-}$ and $\text{p21}^{+/+}$ T cells were purified from spleens of 8- to 10-wk-old mice (used throughout the study unless otherwise specified). CD4^+ cells were Con A stimulated for 3 days and subsequently expanded with IL-2 for 6 days. Cells were then subjected to a second Con A stimulation. After primary stimulation, C57BL/6 $\text{p21}^{-/-}$ and wt T cells responded equally to TCR challenge, as measured by [^3H]thymidine uptake at 24, 48, and 72 h poststimulation (Fig. 1A, *left*), concurring with previous studies (4, 8, 27). To assure that the equal TCR response after primary stimulation was not concentration dependent, as was the case for $\text{p21}^{-/-}$ CD8^+ T cells (32), the assay was repeated with low Con A concentration and similar results were obtained for $\text{p21}^{-/-}$ and wt T cells (Fig. 1A, *right*). These data were corroborated by studies showing that, after primary stimulation, CFSE-labeled $\text{p21}^{-/-}$ and wt T cells showed equal dilution of fluorescence intensity, indicating that in both cases ~95% of the cells proliferated after 72 h after challenge (Fig. 1B). Primary stimulation with high (5 μg) or low (0.5 μg) concentrations of soluble anti-CD3 confirmed that proliferation after primary TCR stimulation was also p21 independent (data not shown). Because it has been reported that p21-deficient thymocytes resist Fas-induced apoptosis (25), we examined whether p21 could affect apoptosis of activated naive T splenocytes. Following primary Con A challenge, cell cycle analysis showed that p21 deficiency did not influence apoptosis induction of T cells at 24, 48, and 72 h poststimulation, nor the proportion of proliferating T cells as illustrated after exposure to Con A (Fig. 1C). We also examined T cell subpopulations by anti-CD4 and anti-CD8 staining in the thymus and found no differences between $\text{p21}^{-/-}$ C57BL/6 and wt mice (data not shown), in agreement with a previous report (32).

Following primary Con A stimulation, IL-2-dependent culture, and secondary TCR challenge, the large majority of T cells undergo apoptosis during the first 24 h (see below). T cells that survive apoptosis proliferate, as measured by [^3H]thymidine uptake at 48 and 72 h poststimulation. We observed a notable increase in $\text{p21}^{-/-}$ T cell proliferation compared with that of wt counterparts (Fig. 1D). These data were corroborated by studies showing that, 72 h after secondary stimulation, CFSE-labeled $\text{p21}^{-/-}$ T cells showed greater dilution of fluorescence intensity than controls (Fig. 1E). In this case, dilution of CFSE generated a single peak probably due to the fact that second Con A-treated T cells were previously proliferating and may have expanded in an almost synchronized fashion.

cells expressed as mean \pm SD (*n* = 4). C, PI staining after 24, 48, and 72 h of primary Con A stimulation. In all cases, values represent the proportion of apoptotic T cells or cycling T cells expressed as mean \pm SD (*n* = 4). D, CD4^+ splenocytes were stimulated with 3 $\mu\text{g/ml}$ Con A, followed by a 6-day IL-2 treatment and a second Con A treatment, and proliferation kinetics were determined by [^3H]thymidine incorporation. E, Dilution of fluorescence intensity in CFSE-labeled (live gated, PI-negative) CD4^+ T cells 72 h after secondary Con A stimulation. The filled histogram represents the fluorescence of CFSE-labeled, but not stimulated, cells. Median fluorescence intensity values for $\text{p21}^{-/-}$, 140 ± 8 vs wt 417 ± 12 (*n* = 4; *p* < 0.0003). F, T cells were stimulated for five rounds of Con A, each followed by IL-2-dependent expansion. Each Con A stimulation was evaluated in parallel with primary stimulation of wt CD4^+ lymphocytes to confirm stimulation equivalence. Representative data are shown for one of five independent experiments. G, Degree of proliferation of cells cultured for 6 days with IL-2 after primary, secondary, and tertiary Con A treatments. For F and G, values represent mean \pm SD (*n* = 5).

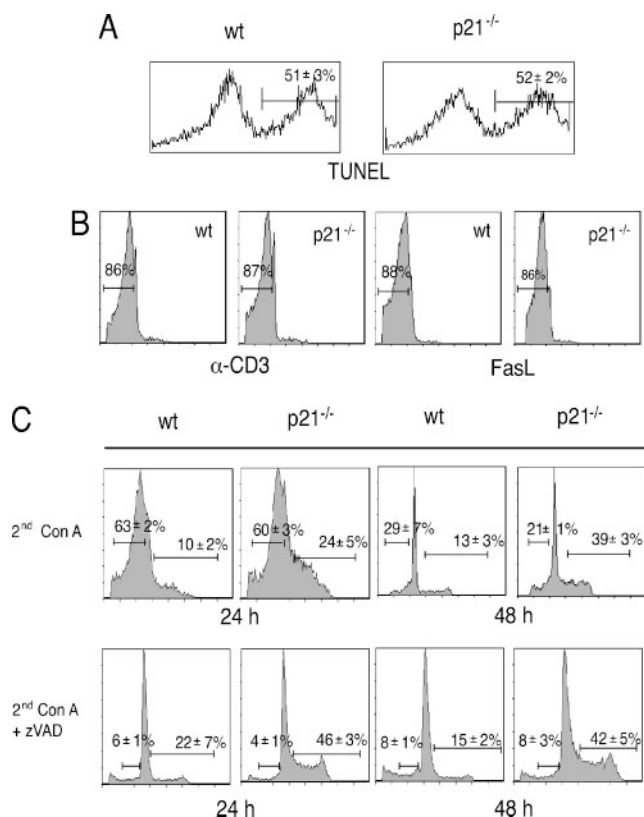


FIGURE 2. Apoptosis characteristics of p21^{-/-} T cells. *A*, TUNEL analysis 24 h after secondary Con A stimulation of CD4⁺ T cells. *B*, PI staining of T cells treated with anti-CD3 or FasL for 12 h. Proportions of apoptotic T cells correspond to one representative mouse of five tested. *C*, PI staining of secondary Con A-challenged T cells alone (*top*) or with zVAD (*bottom*). In all cases, values represent the proportion of apoptotic T cells or cycling T cells expressed as mean ± SD ($n = 4$).

The increased proliferation potential of p21^{-/-} T cells was not confined to secondary TCR stimulation, because after IL-2 expansion and a third Con A challenge, p21^{-/-} T cells proliferated at higher rates than controls (Fig. 1*F*). p21 deletion increased the potential for repeated stimulation, because p21^{-/-} T cells proliferated after as many as five stimulation cycles, whereas wt T cells responded to no more than three Con A challenges (Fig. 1*F*). When stimulated with anti-CD3 and anti-IL-2, or with anti-CD3 and anti-CD28, p21^{-/-} T cells maintained their hyperproliferative capacity compared with wt T cells (data not shown). We obtained similar results using p21^{-/-} CD8⁺ T cells (data not shown).

In 129/Sv × C57BL/6 mouse T cells, we previously showed that p21 influences proliferation during the late phase of IL-2 expansion, specifically at 6 days postprimary TCR stimulation (4); this effect was confirmed in this study (Fig. 1*G*). p21^{-/-} T cell proliferation increased compared with wt controls during IL-2 expansions, not only after primary Con A stimulation, but also after secondary and tertiary TCR challenge (Fig. 1*G*).

Intact apoptosis in repeatedly activated p21^{-/-} T cells

Secondary stimulation leads to apoptosis of a large proportion of T cells. We tested whether p21^{-/-} T cell hyperproliferation was due to an increase in proliferating, apoptosis-resistant T cells caused by a p21 deficiency-associated apoptotic defect. This possibility appeared unlikely, because p21^{-/-} T cells showed greater CFSE dilution than wt T cells after secondary TCR challenge (Fig. 1*E*), indicating that p21^{-/-} T cells undergo a large number of divi-

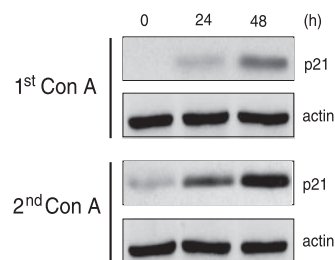


FIGURE 3. p21 expression in wt T cells after Con A treatment. p21 protein levels in T cells were measured in Western blot at the indicated times after primary or secondary Con A stimulation. Time point 0 h for the second Con A stimulation corresponds to the end of IL-2-dependent expansion.

sions. In addition, apoptosis was minimal during IL-2 expansion, with no differences between p21^{-/-} and wt T cells (data not shown) (4), whereas p21 deficiency led to increased T cell proliferation during IL-2 treatment (Fig. 1*G*).

To examine directly whether lack of p21 affected the apoptosis rate, we measured activation-induced cell death (AICD) by TUNEL after secondary Con A stimulation and found no difference between p21^{-/-} and wt T cell apoptosis levels (Fig. 2*A*). To confirm that AICD and p21 deficiency are unrelated, we treated IL-2-expanded T cells with anti-CD3 or FasL. PI staining showed no difference in apoptosis induction between p21^{-/-} and wt T cells at 12 h posttreatment (Fig. 2*B*).

We also measured apoptosis and cell cycle by PI staining after secondary challenge, and found no differences in apoptosis induction 24 or 48 h after secondary Con A challenge (Fig. 2*C, top*). As anticipated, we detected a larger proportion of cycling p21^{-/-} than of cycling wt T cells (Fig. 2*C, top*). To examine T cell proliferation independently of apoptosis, T cells received a secondary Con A challenge in the presence of the apoptosis inhibitor zVAD that inhibits apoptosis via caspase inactivation (33). zVAD-treated p21^{-/-} and wt T cells did not die by apoptosis, but both showed a transient increase in proliferation at 24 h postchallenge, which normalized by 48 h (Fig. 2*C, bottom*). The proportional increase in p21^{-/-} T cell proliferation compared with that of wt cells was nonetheless similar with or without zVAD at 24 and 48 h after secondary stimulation (Fig. 2*C, compare top and bottom*). The data show that apoptosis does not affect the hyperproliferative capacity of T cells conferred by p21 deletion.

p21 expression after primary and secondary Con A stimulation of wt T cells

The data showed a critical role for p21 in proliferation of activated lymphocytes after secondary challenge, but not after TCR-mediated activation of naive T cells. To clarify the differential p21 requirement in these two cases, we examined p21 protein expression kinetics during stimulation of naive and activated wt T cells. p21 levels were undetectable by Western blot in steady-state naive T cells (Fig. 3). At 24 h poststimulation, p21 expression was evident, and rose to higher levels by 48 h (Fig. 3); p21^{-/-} and wt T cells nonetheless proliferated similarly, as tested at 72 h poststimulation (Fig. 1*A, left*). Although IL-2-expanded T lymphocytes had low p21 levels, p21 expression rose rapidly at 24 h after secondary Con A challenge and continued to rise at 48 h (Fig. 3), with overall levels higher than after primary Con A stimulation.

Consecutive TCR stimulations without IL-2 expansion require p21 for T cell proliferation control

After IL-2-dependent stimulation, a secondary TCR challenge led to excessive cycling of apoptosis-surviving p21^{-/-} T cells. To

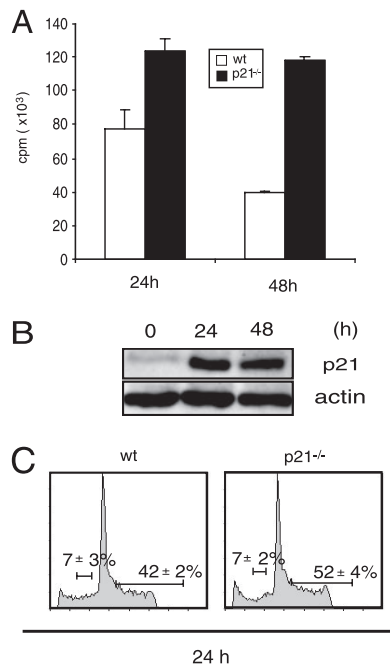


FIGURE 4. Proliferative responses of CD4⁺ T cells after two consecutive Con A treatments. CD4⁺ T splenocytes were subjected to two consecutive Con A challenges without intermediate IL-2 treatment. *A*, [³H]Thymidine incorporation 24 and 48 h after the second Con A treatment. Values represent mean ± SD (*n* = 5) for p21^{-/-} and wt T cells (24 h, *p* < 0.0008; 48 h, *p* < 0.0001). *B*, p21 expression in T cells was measured in Western blot at the indicated times after the second Con A stimulation (the 0-h time point corresponds to the end of the first Con A stimulation). *C*, PI staining of T cells 24 h after the second Con A treatment. The proportion of apoptotic and cycling T cells is represented as mean ± SD (*n* = 5).

determine whether IL-2 expansion was required for p21 deficiency-dependent T cell hyperproliferation after secondary stimulation, we subjected T cells to two successive TCR challenges without intermediate IL-2 treatment. CD4⁺ cells were washed 72 h after primary stimulation and immediately restimulated with Con A. This type of stimulation revealed a proliferative advantage of p21^{-/-} compared with wt T cells 24 and 48 h after secondary challenge (Fig. 4A). Under these conditions, however, p21^{-/-} or wt T cells did not undergo apoptosis (Fig. 4C). The results show that the p21 requirement in T cell cycle regulation is manifested during the second round of TCR stimulation and is independent of the IL-2 expansion stage.

We next examined p21 protein levels in p21^{+/+} T cells before and after secondary challenge. The data showed a considerable increase in p21 protein after secondary Con A stimulation compared with primary stimulation (Fig. 4B), suggesting that p21 levels are critical for control of repetitive T cell proliferation.

We also analyzed the cell cycle profile of p21^{-/-} and wt T cells after secondary Con A stimulation. Apoptosis was minimal for both p21^{-/-} and wt T cells under these stimulation conditions (Fig. 4C), whereas, as anticipated, we detected a large proportion of cycling p21^{-/-} compared with wt T cells. These results corroborate the data showing that p21^{-/-} T cell hyperproliferation is apoptosis independent.

Activation/memory phenotypes of T cells after repeated stimulation

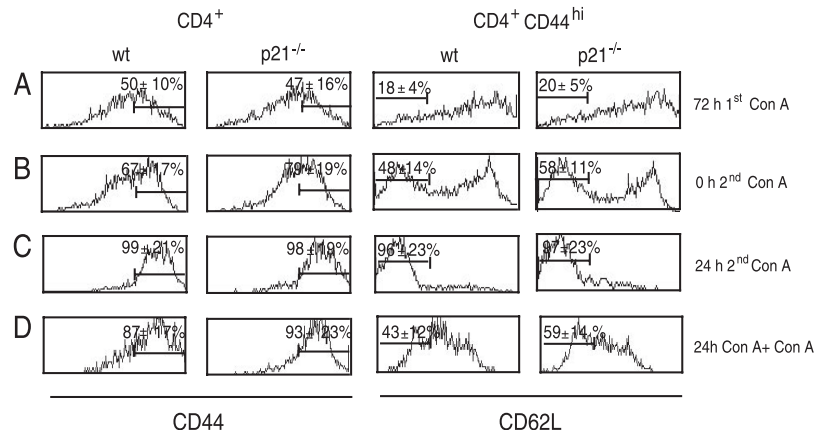
T cells were considered to be of memory phenotype when they expressed CD44^{high} and CD62L^{low}. At the end of the first Con A stimulation there were no proliferative differences between p21^{-/-} and wt T cells detected (Fig. 1A, left); there was no substantial shift to memory phenotype (Fig. 5A). At the end of the IL-2 expansion, the proportion of memory T cells was increased (Fig. 5B). Hyperproliferation of p21^{-/-} T cells during this treatment suggests that p21 control of proliferation is associated with a specific activated/memory phenotype. This is supported by the increased representation of memory CD62L^{low} T cells within the population of CD4⁺CD44⁺-activated T cells in p21^{-/-} vs wt cultures (*p* < 0.0005) (Fig. 5B). Furthermore, memory T cells generated 24 h after secondary Con A challenge (Fig. 5C) hyperproliferated in the absence of p21 at 48 and 72 h postchallenge (Fig. 1D).

After two successive Con A stimulations with no intermediate IL-2 culture, there was a marked shift toward memory phenotype 24 h after secondary Con A stimulation (Fig. 5D), again associating p21 deficiency with increased activated/memory T cell proliferation (Fig. 4A).

Memory T cell accumulation and autoimmune disease in p21^{-/-} mice

The association of p21 deficiency with increased activated/memory T cell proliferation has in vivo implications. Representation of memory T cells (CD4⁺CD44^{high}CD62L^{low}) within the CD4⁺ T cell population in the spleens of 2-mo-old C56BL/6 p21^{-/-} and wt mice was similar (<3%). However, we observed enhanced accumulation of memory T cells in spleens of 6-mo-old p21^{-/-} female and male mice compared with wt controls (*p* < 0.0001 for females and *p* < 0.008 for males; Fig. 6A). Memory T cell accumulation was significantly higher in p21^{-/-} female mice compared with

FIGURE 5. Phenotype characterization of CD4⁺ T cells after in vitro TCR challenge. T cells were triple stained for CD4, CD44, and CD62L. Levels of CD44 expression in CD4⁺ cells or of CD62L expression in CD4⁺CD44^{high} cells are shown as follows: at the end of primary Con A stimulation (*A*), at the end of IL-2-dependent expansion (*B*), 24 h after the secondary Con A stimulation that follows IL-2 expansion (*C*), and 24 h after the secondary Con A stimulation without intermediate IL-2 expansion (*D*). Data are represented as mean ± SD (*n* = 4).



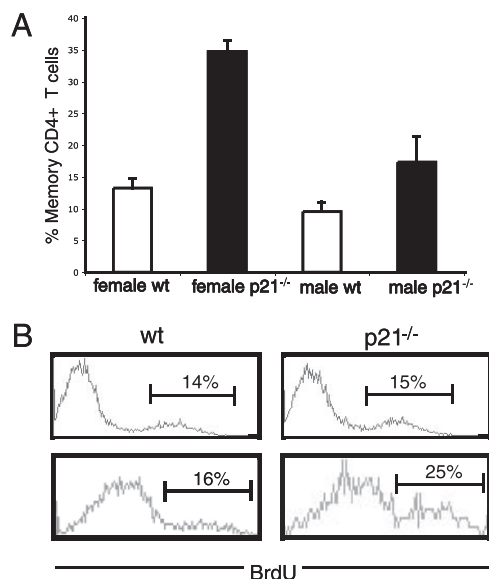


FIGURE 6. Accumulation of memory phenotype CD4⁺ T cells in p21^{-/-} mice. **A**, Proportion of memory CD4⁺CD44^{high}CD62L^{low} T cells in 6-mo-old mouse spleens. **B**, In vivo BrdU incorporation by CD4⁺CD44^{high} T splenocytes from 2-mo (*top*)- and 6-mo (*bottom*)-old mice given BrdU containing water. Data are shown from representative mice; values are mean \pm SD ($n = 6$; $p < 0.0015$).

male counterparts ($p < 0.005$; Fig. 6A). Comparable increases in memory CD4⁺ T cell accumulation in female vs male mice were reported for mixed background (129/Sv \times C57BL/6) p21^{-/-} mice (4). CD8⁺ T cells did not accumulate preferentially in p21^{-/-} mixed background mice (4). Similarly, CD8⁺ memory T cells were equally represented in 6-mo-old p21^{-/-} C57BL/6 ($13 \pm 4\%$) and wt controls ($12 \pm 3\%$). Overall, the data show that in vivo accumulation, and therefore homeostasis, of memory CD4⁺ T cells depends on p21.

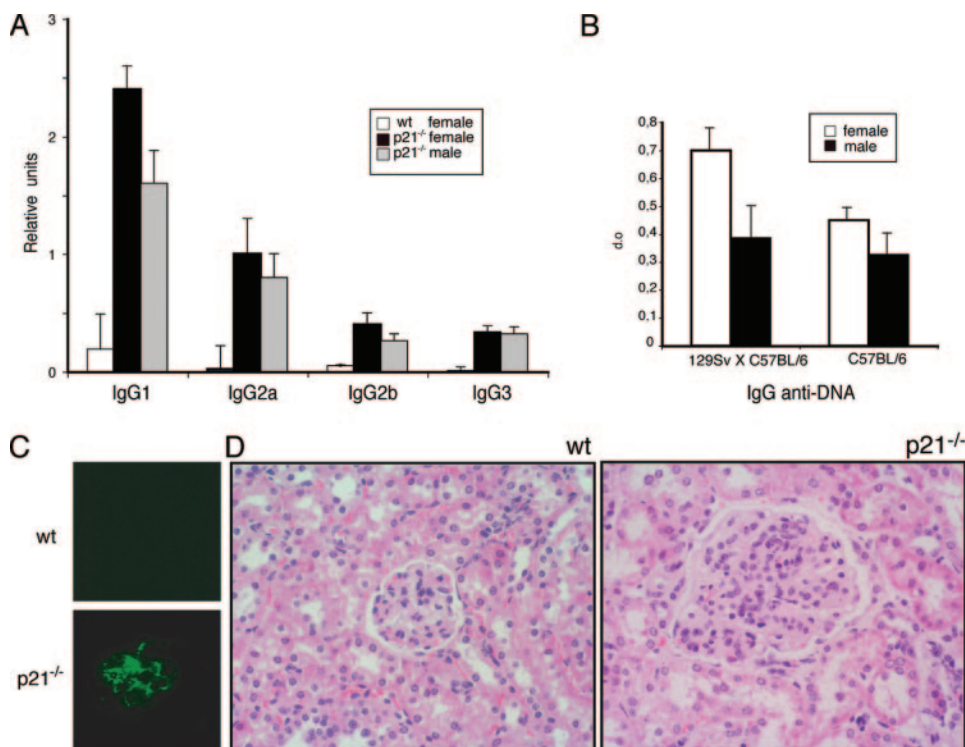
We next used BrdU incorporation to test the effect of p21 deficiency on in vivo memory T cell proliferation. Although CD4⁺ T cells from 2-mo-old p21^{-/-} and wt mice proliferated similarly (Fig. 6B, *top*), we found that CD4⁺ memory T cells from 6-mo-old p21^{-/-} mice had an in vivo proliferative advantage compared with controls (Fig. 6B, *bottom*).

We previously reported that 129/Sv \times C57BL/6 p21^{-/-} mice, particularly females, develop autoimmune characteristics, including splenomegaly, lymphadenopathy, and severe lupus-like disease (4). To exclude genetic background interference, in this study we analyzed lupus autoimmunity development in C57BL/6 p21^{-/-} mice. At 12 mo of age, C57BL/6 p21^{-/-} mice had normal spleens and LNs, but developed high levels of anti-dsDNA Ab of all IgG isotypes compared with age-matched C57BL/6 controls (Fig. 7A). Autoantibody production by C57BL/6 p21^{-/-} mice was nonetheless much lower than in mixed background counterparts (Fig. 7B). By 12 mo, male and female mice had glomerular IgG deposits (Fig. 7C) and developed moderate glomerulonephritis (Fig. 7D; scores: p21^{-/-} females, 2.4 ± 0.6 ; p21^{-/-} males, 2.2 ± 0.4 vs wt females and males, 0.0 ± 0.0 ; $n = 10$ mice/group). Because glomerulonephritis did not reach acute scores, C57BL/6 p21^{-/-} mouse survival was high at 1 year of age (data not shown). Lupus-like disease was less severe in C57BL/6 p21^{-/-} mice than in mixed background p21^{-/-} females (4), which developed lethal glomerulonephritis at 9–12 mo. These data show that full-blown lupus development requires p21 deletion as well as elements from the 129/Sv \times C57BL/6 genetic background.

p21 deficiency enhances T cell memory responses in p21^{-/-} mice

The results indicated that p21^{-/-} T cells hyperproliferate and that p21 acquires a role in cycling regulation in activated/memory cells. We tested whether the hyperproliferation seen in vitro generated p21^{-/-} activated/memory T cells could also be observed in vivo. Sorted memory (CD4⁺CD44^{high}CD62L^{low}) and naive (CD4⁺CD44^{high}CD62L^{high}) T cells from 6-mo-old p21^{-/-} and wt mice

FIGURE 7. Lupus-like disease in C57BL/6 p21^{-/-} mice. **A**, Serum concentrations of anti-dsDNA IgG isotypes in 12-mo-old wt ($n = 6$) and p21^{-/-} female ($n = 6$) and male mice ($n = 6$). **B**, Serum concentrations of total anti-dsDNA Ab from 9-mo-old 129/Sv \times C57BL/6 p21^{-/-} and C57BL/6 p21^{-/-} mice ($n = 5$). **C**, Characteristic IgG deposits in glomeruli of 12-mo-old C57BL/6 wt and p21^{-/-} female mice. **D**, Glomeruli of 12-mo-old mice. The glomerulus of the p21^{-/-} mouse shows glomerulonephritis (3⁺) with hypertrophy and hyperplasia of mesangial cells, as well as expanded mesangium that obliterated the capillary turf. Original magnification $\times 40$. For A and B, values are mean \pm SD.



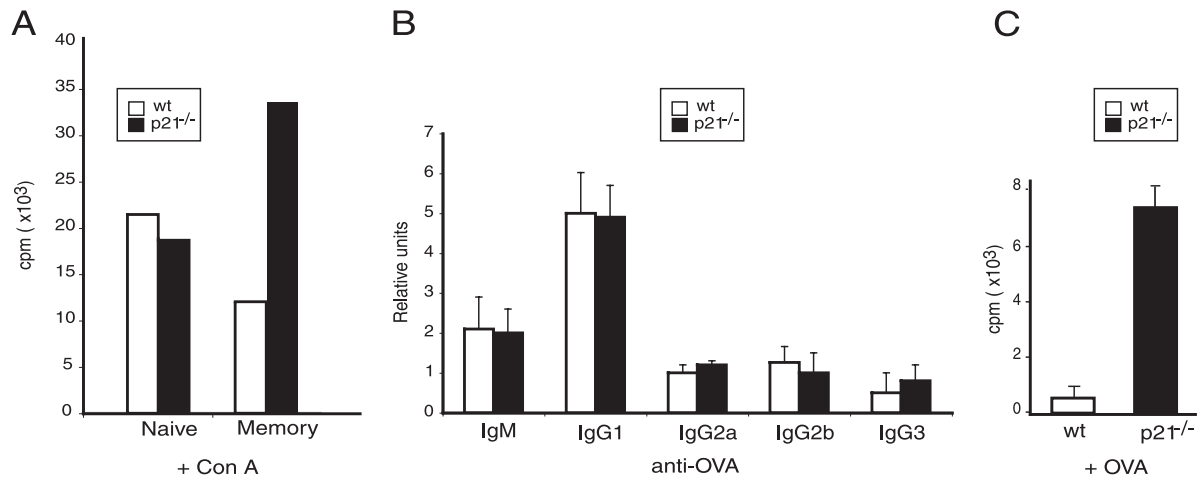


FIGURE 8. Effect of p21 deficiency on in vivo generated memory T cells. *A*, [³H]Thymidine incorporation rates of sorted CD4⁺CD44^{high}CD62L^{low} T cells from 6-mo-old wt and p21^{-/-} mice; cells were Con A and IL-2 stimulated in vitro for 48 h. Data correspond to pooled cells from four mice in one of three independent experiments. *B*, Anti-OVA IgG isotype levels in serum of wt ($n = 8$) and p21^{-/-} female mice ($n = 8$) 1 wk after the OVA plus IFA boost. *C*, Bead-purified CD4⁺ cells were isolated 7 days after the OVA plus IFA boost. The wt and p21^{-/-} cells were cultured with OVA and irradiated splenocytes, and proliferation was measured 24 h postactivation by [³H]thymidine incorporation. Values represent mean \pm SD ($n = 4$) of one of two experiments ($p < 0.001$).

were Con A stimulated. As predicted, p21^{-/-} memory T cells proliferated at much higher rates than did controls by an average of $42 \pm 8\%$ ($n = 3$; $p < 0.003$) (Fig. 8A). p21 deletion did not influence naive T cell proliferation (Fig. 8A). These data suggest a role for p21 in memory T cell proliferation and homeostasis in vivo.

To determine whether p21 deficiency affected the T memory response to a model Ag in mice, we immunized p21^{-/-} and wt mice with OVA in CFA. OVA challenge in IFA 3 wk after primary immunization produced no difference in anti-OVA Ab levels in the two mouse groups (Fig. 8B). Independently of the anti-OVA Ab response, we tested whether p21 deficiency affected T cell memory responses after OVA immunization. Purified CD4⁺ splenocytes from p21^{-/-} and wt mice were obtained 7 days after a second OVA boost, and were cultured with OVA and irradiated splenocytes. p21^{-/-}, but not wt T cells showed an immediate response to OVA at 24 h postactivation (Fig. 8C). These results corroborate in vitro findings that link p21 deficiency to a major increase in memory T cell proliferation.

Discussion

Although previous studies showed that p21 has a role in various T cell proliferation systems, the conditions that render T cell proliferation p21 dependent remained undefined (4, 8, 14, 28, 29). In this study, we explored the role of p21 in T cell proliferation of activated/memory T cells and reached the following conclusions: 1) p21 does not affect naive T cell proliferation, but exerts its control on activated/memory T cells; 2) p21 does not affect AICD, but regulates proliferation of memory T cells that survive AICD; 3) p21 regulates responses of in vivo generated memory T cells; and 4) p21 deficiency increases CD4⁺ memory cell accumulation in aging C57BL/6 p21^{-/-} mice in a sex-dependent manner and leads to typical lupus glomerulonephritis.

Because one goal was to dissect the exact role of p21 on the immune response independently of mixed background influences, we analyzed C57BL/6 p21^{-/-} mice. Memory T cells accumulate in C57BL/6 p21^{-/-} mice in vivo, more so in females than in males, suggesting an effect of the female hormonal environment in association with p21 deletion. This sex difference was not trans-

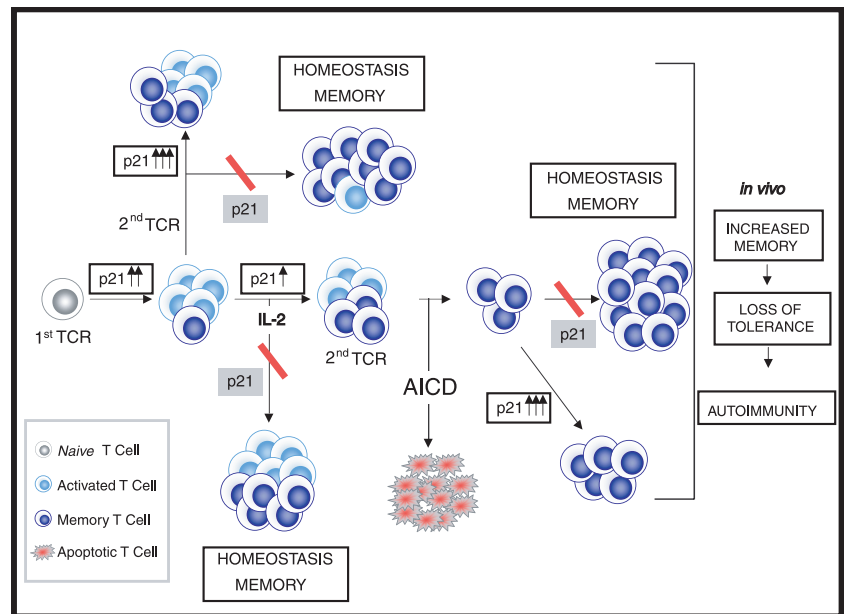
lated into more acute lupus disease in female than in male p21^{-/-} mice, as was the case for mixed background p21^{-/-} mice (4).

C57BL/6 p21^{-/-} mice develop all lupus characteristics, including moderate glomerulonephritis. The genetic elements of the mixed background (6) and the female hormonal environment that enhance lupus disease (34, 35), in conjunction with the lack of p21, promote acute disease in 129/Sv \times C57BL/6 female mice (4, 8). We thus conclude that for full-blown disease development in females, both p21 deletion and other genetic components are necessary. This result was anticipated (4, 7) due to the multifactorial nature of lupus. Indeed, genetic background is a determining factor for lupus disease development in mice with mutations for lupus-related genes (36, 37); thus, whereas lack of Fas leads to full-blown lupus in combination with the MRL background, it causes milder disease in C57BL/6 mice (38).

To examine whether p21 controls memory T cell proliferation, we used a classical model of memory T cell derivation, in which homeostasis is presumed to occur by apoptosis (39). After Con A stimulation and IL-2 expansion, T cells are rechallenged with Con A. Although the majority of the cells die by Fas-mediated apoptosis, a small proportion of memory phenotype T cells survives. Using various approaches, we concluded that p21 does not affect AICD in the C57BL/6 background.

In a previous study, it was reported that, in the BXSB atypical lupus model, TCR-stimulated BXSB p21^{-/-} T cells hyperproliferate and exhibit similar apoptosis levels compared with BXSB controls 24 h after stimulation (10, 13). Nevertheless, increased apoptosis was detected 3 days after secondary culture with anti-CD3 Abs for BXSB p21^{-/-}. We have shown in this study by a variety of different systems that p21 deficiency does not influence AICD. However, p21^{-/-} T cells that survive apoptosis 24 h after secondary challenge proliferate excessively compared with controls and reach the highest degree of hyperproliferation 3 days after secondary challenge. These findings raise the possibility that the increased apoptosis observed in BXSB mice 3 days after secondary challenge may be an indirect effect of the hyperproliferation of T cells, an issue that could perhaps be clarified in a future study. On the basis of the reduced autoimmune manifestations exhibited

FIGURE 9. A model showing p21 control of activated/memory T cell proliferation. The p21 control points are represented by red bars, and indicate that p21 deficiency leads to hyperproliferation of activated/memory T cells. This hyperproliferation can be translated into deregulated homeostasis of memory T cells. p21 expression levels at different stages of T cell activation are depicted by a number of arrows ranging from 1 to 3.



by male BXSB $p21^{-/-}$ mice, it was concluded that increased apoptosis of memory male BXSB $p21^{-/-}$ T cells led to their reduced representation and disease improvement (13). This view, however, has been challenged by others (14) because $p21^{-/-}$ T cells from BXSB female mice (10) presumably exhibit increased apoptosis like their male counterparts (13), but memory T cells are not reduced in female mice. It appears that the disease improvement in male $p21^{-/-}$ BXSB mice may represent an interaction between the p21 and the *Yaa* gene, in particular at the B cell level, because it has been undoubtedly shown that the direct effect of the *Yaa* gene occurs rather at the B, than at the T cell level (40, 41). Finally, the particular BXSB background may confound the effects of p21 in memory T cell generation and autoimmunity, something that is now evident from our studies with C57BL/6 $p21^{-/-}$ mice. We believe that the nonautoimmune C57BL/6 background offers more clear-cut conditions for defining the role of p21 in T cell apoptosis and/or proliferation.

Our data from the repeated T cell activation experiments showed that p21 does not affect AICD. Apoptosis-resistant T cells require p21 to control their proliferation, however, which may comprise a homeostatic mechanism that regulates memory T cell expansion. In addition to repetitive Ag stimulation, memory T cells can be derived after a single TCR stimulation (42, 43). According to this model and as shown by our data, memory T cells are generated after extensive IL-2 treatment following primary stimulation (Fig. 5B). In another approach to generate memory T cells, we subjected cells to two consecutive Con A stimulations. Hyperproliferation of activated/memory $p21^{-/-}$ T cells derived by these two methods confirmed that memory T cells require p21 for control of proliferation. Because apoptosis is minimal during IL-2-dependent T cell expansion and after two consecutive Con A treatments, proliferation control by p21 appears to be the major pathway limiting activated/memory T cell expansion. These results suggest that certain forms of memory T cell homeostasis can be apoptosis independent and are regulated by cell cycle control mechanisms. Our model (Fig. 9) shows the experimental approaches used to generate activated/memory T cells and indicates p21 regulation points of T cell proliferation, as well as immune functions that may be controlled by p21, such as memory and homeostasis.

Our data showing that deletion of p21 affects the proliferation of activated/memory T cells, but not that of naive T cells after TCR challenge may explain an apparent conflict among previous studies. Although primary stimulation of naive T cells was shown to be p21 independent by different groups (4, 8, 27), another study argued that p21 deficiency led to increased proliferation after primary activation (7). These authors of the latter study used T cells from LN of older (4- to 6-mo-old) mice that presumably include a proportion of activated/memory T cells. Therefore, the increased proliferation possibly represented the response of activated/memory LN cells and not of naive T cells to TCR challenge. We believe that as we examined primary proliferation at different time points, under varying strength stimulation conditions, and using naive cells from older and younger mice, it is established that p21 deficiency does not affect the proliferation of naive TCR-challenged T cells.

We show a role for p21 in the regulation of activated/memory T cell proliferation, although the precise mechanism by which p21 exerts its control is not defined. A possible explanation for p21 control of T cell proliferation is the degree of p21 expression, represented schematically in Fig. 9 in association with the different types of stimulation. p21 expression levels in wt T cells are higher after secondary than after primary stimulation (Fig. 9). Because p21 does not influence proliferation after primary activation, it could be suggested that the degree of p21 expression is critical for T cell proliferation control. Alternatively, despite the low p21 levels expressed by T cells during IL-2 treatment (Fig. 9), p21 has a critical role in regulating proliferation during IL-2 expansion. This apparent paradox could be explained by considering that T cell differentiation status may potentiate the ability of p21 to regulate proliferation. Although the mechanism for p21 regulation of T cell proliferation must be addressed in detail, our data point to the possibility that both the T cell differentiation stage and p21 expression levels may influence this mechanism.

One question raised by our results is why there is a requirement for p21 in memory T cell proliferation and not in naive T cells. Apparently, the cell cycle machinery is differentially regulated in the two different types of T cells. It could be proposed that an increase in p21 may lead to a form of replicative senescence in memory phenotype cells because replicative senescence is induced

after extensive T cell cycling (44). This possibility, however, seems unlikely, because, in experiments of only two constitutive Con A treatments in which senescence is unlikely to play a role, p21^{-/-} T cells proliferated more than controls (Fig. 4A). What seems more likely is that primary stimulation of T cells leads to a memory phenotype that potentiates the requirement for p21 in the control of proliferation. An explanation for the differential role of p21 in naive and memory T cell proliferation could be based on epigenetic modifications that occur during the transit of naive to memory T cells (45). Thus, epistatically modified memory T cells are programmed to respond rapidly after Ag encounter (45), and therefore, may require p21 to subside this excessive response.

The association between p21 deficiency and T cell memory has in vivo implications, because immunization studies with OVA showed that p21 deficiency confers hyperresponsiveness on OVA-specific T cells. The fact that the exacerbated T cell response is not translated to increased Ab production might reflect B cell response inhibition by lack of p21. Indeed, in caspase-3 knockout mice, which have an overactive B cell response, p21 deletion reduces B cell hyperproliferation (46).

The hyperresponsiveness of p21^{-/-} T cells after immunization suggests that in vivo generated memory T cells require p21 to control their expansion. This was confirmed because memory T cells from p21^{-/-} mice hyperproliferated after TCR challenge. By regulating proliferation of memory T cells, p21 thus may control their homeostasis, assuring an adequate proportion of memory cells in the total T cell population. To explain anti-DNA Ab production and autoimmunity in p21^{-/-} mice, we suggest that p21 deficiency may lead to memory T cell hyperproliferation and, following persistent encounter with autoantigens, to deregulated homeostasis and loss of tolerance.

We examined the role of p21 in the control of activated/memory T cell proliferation in vitro and the association of this property with memory cell responses. p21 control of activated/memory T cell proliferation in a variety of conditions assigns this cell cycle inhibitor the role of a broad controller of memory T cell proliferative responses. Our findings also link p21 with in vivo memory T cell proliferation, and establish grounds for further investigation of the role of p21 in memory T cell responses and homeostasis, and in tolerance establishment.

Acknowledgments

We thank L. Gómez for animal work and C. Mark for editorial assistance.

Disclosures

The authors have no financial conflict of interest.

References

- Harper, J. W., G. R. Adami, N. Wei, K. Keyomarsi, and S. J. Elledge. 1993. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G₁ cyclin-dependent kinases. *Cell* 75: 805–816.
- Brugarolas, J., C. Chandrasekaran, J. I. Gordon, D. Beach, T. Jacks, and G. J. Hannon. 1995. Radiation-induced cell cycle arrest compromised by p21 deficiency. *Nature* 377: 552–557.
- Deng, C., P. Zhang, J. W. Harper, S. J. Elledge, and P. Leder. 1995. Mice lacking p21^{Cip1}/WAF1 undergo normal development, but are defective in G₁ checkpoint control. *Cell* 82: 675–684.
- Balomenos, D., J. Martin-Caballero, M. I. Garcia, I. Prieto, J. M. Flores, M. Serrano, and A. C. Martinez. 2000. The cell cycle inhibitor p21 controls T-cell proliferation and sex-linked lupus development. *Nat. Med.* 6: 171–176.
- Nguyen, C., N. Limaye, and E. K. Wakeland. 2002. Susceptibility genes in the pathogenesis of murine lupus. *Arthritis Res.* 4(Suppl. 3): S255–S263.
- Bygrave, A. E., K. L. Rose, J. Cortes-Hernandez, J. Warren, R. J. Rigby, H. T. Cook, M. J. Walport, T. J. Vyse, and M. Botto. 2004. Spontaneous autoimmunity in 129 and C57BL/6 mice: implications for autoimmunity described in gene-targeted mice. *PLoS Biol.* 2: e243.
- Santiago-Raber, M. L., B. R. Lawson, W. Dummer, M. Barnhouse, S. Koundouris, C. B. Wilson, D. H. Kono, and A. N. Theofilopoulos. 2001. Role of cyclin kinase inhibitor p21 in systemic autoimmunity. *J. Immunol.* 167: 4067–4074.
- Salvador, J. M., M. C. Hollander, A. T. Nguyen, J. B. Kopp, L. Barisoni, J. K. Moore, J. D. Ashwell, and A. J. Fornace, Jr. 2002. Mice lacking the p53-effector gene Gadd45a develop a lupus-like syndrome. *Immunity* 16: 499–508.
- Merino, R., T. Shibata, S. De Kossodo, and S. Izui. 1989. Differential effect of the autoimmune *Yaa* and *lpr* genes on the acceleration of lupus-like syndrome in MRL/MpJ mice. *Eur. J. Immunol.* 19: 2131–2137.
- Lawson, B. R., D. H. Kono, and A. N. Theofilopoulos. 2002. Deletion of p21^{WAF1/Cip1} does not induce systemic autoimmunity in female BXSB mice. *J. Immunol.* 168: 5928–5932.
- Balomenos, D., C. Carvalho-Pinto, and A. C. Martinez. 2002. Still waiting for the end: the promise of genomics and proteomics for autoimmune diseases. *EMBO Rep.* 3: 104–107.
- Wandstrat, A., and E. Wakeland. 2001. The genetics of complex autoimmune diseases: non-MHC susceptibility genes. *Nat. Immunol.* 2: 802–809.
- Lawson, B. R., R. Baccala, J. Song, M. Croft, D. H. Kono, and A. N. Theofilopoulos. 2004. Deficiency of the cyclin kinase inhibitor p21^{WAF1/Cip1} promotes apoptosis of activated/memory T cells and inhibits spontaneous systemic autoimmunity. *J. Exp. Med.* 199: 547–557.
- Goulvestre, C., C. Chereau, C. Nicco, L. Mouthon, B. Weill, and F. Batteux. 2005. A mimic of p21^{WAF1/Cip1} ameliorates murine lupus. *J. Immunol.* 175: 6959–6967.
- Swain, S. L. 2003. Regulation of the generation and maintenance of T-cell memory: a direct, default pathway from effectors to memory cells. *Microbes Infect.* 5: 213–219.
- Moulton, V. R., and D. L. Farber. 2006. Committed to memory: lineage choices for activated T cells. *Trends Immunol.* 27: 261–267.
- Freitas, A. A., and B. Rocha. 2000. Population biology of lymphocytes: the flight for survival. *Annu. Rev. Immunol.* 18: 83–111.
- Grossman, Z., and W. E. Paul. 2000. Self-tolerance: context dependent tuning of T cell antigen recognition. *Semin. Immunol.* 12: 197–203.
- Murga, M., O. Fernandez-Capetillo, S. J. Field, B. Moreno, L. R. Borlado, Y. Fujiwara, D. Balomenos, A. Vicario, A. C. Carrera, S. H. Orkin, et al. 2001. Mutation of E2F2 in mice causes enhanced T lymphocyte proliferation, leading to the development of autoimmunity. *Immunity* 15: 959–970.
- Balomenos, D., and A. C. Martinez. 2000. Cell-cycle regulation in immunity, tolerance and autoimmunity. *Immunol. Today* 21: 551–555.
- Carvalho-Pinto, C., M. I. Garcia, L. Gomez, A. Ballesteros, A. Zaballos, J. M. Flores, M. Mellado, J. M. Rodriguez-Frade, D. Balomenos, and A. C. Martinez. 2004. Leukocyte attraction through the CCR5 receptor controls progress from insulinitis to diabetes in non-obese diabetic mice. *Eur. J. Immunol.* 34: 548–557.
- King, C., A. Ilic, K. Koelsch, and N. Sarvetnick. 2004. Homeostatic expansion of T cells during immune insufficiency generates autoimmunity. *Cell* 117: 265–277.
- Gartel, A. L., and A. L. Tyner. 2002. The role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in apoptosis. *Mol. Cancer Ther.* 1: 639–649.
- Suzuki, A., Y. Tsutomi, K. Akahane, T. Araki, and M. Miura. 1998. Resistance to Fas-mediated apoptosis: activation of caspase 3 is regulated by cell cycle regulator p21^{WAF1} and IAP gene family ILP. *Oncogene* 17: 931–939.
- Hingorani, R., B. Bi, T. Dao, Y. Bae, A. Matsuzawa, and I. N. Crispe. 2000. CD95/Fas signaling in T lymphocytes induces the cell cycle control protein p21^{Cip1}/WAF1, which promotes apoptosis. *J. Immunol.* 164: 4032–4036.
- Fotedar, R., H. Brickner, N. Saadatmandi, T. Rousselle, L. Diederich, A. Munshi, B. Jung, J. C. Reed, and A. Fotedar. 1999. Effect of p21^{WAF1/Cip1} transgene on radiation induced apoptosis in T cells. *Oncogene* 18: 3652–3658.
- Zhang, S., V. A. Lawless, and M. H. Kaplan. 2000. Cytokine-stimulated T lymphocyte proliferation is regulated by p27^{Kip1}. *J. Immunol.* 165: 6270–6277.
- Khanna, A. K., and J. D. Hosenpud. 2000. In vitro and in vivo transfection of p21 gene enhances cyclosporin A-mediated inhibition of lymphocyte proliferation. *J. Immunol.* 165: 1882–1888.
- Khanna, A. K., M. Plummer, V. Nilakantan, and G. M. Pieper. 2005. Recombinant p21 protein inhibits lymphocyte proliferation and transcription factors. *J. Immunol.* 174: 7610–7617.
- Witmer, P. D., K. F. Doherty, M. K. Adams, C. D. Boehm, J. S. Dizon, J. L. Goldstein, T. M. Templeton, A. M. Wheaton, P. N. Dong, E. W. Pugh, et al. 2003. The development of a highly informative mouse simple sequence length polymorphism (SSLP) marker set and construction of a mouse family tree using parsimony analysis. *Genome Res.* 13: 485–491.
- Carvalho-Pinto, C. E., M. I. Garcia, M. Mellado, J. M. Rodriguez-Frade, J. Martin-Caballero, J. Flores, A. C. Martinez, and D. Balomenos. 2002. Autocrine production of IFN- γ by macrophages controls their recruitment to kidney and the development of glomerulonephritis in MRL/lpr mice. *J. Immunol.* 169: 1058–1067.
- Wolfrum, L. A., and J. J. Letterio. 2005. Cutting edge: p27^{Kip1} deficiency reduces the requirement for CD28-mediated costimulation in naive CD8⁺ but not CD4⁺ T lymphocytes. *J. Immunol.* 174: 2481–2484.
- Slee, E. A., H. Zhu, S. C. Chow, M. MacFarlane, D. W. Nicholson, and G. M. Cohen. 1996. Benzoyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp (OMe) fluoromethylketone (Z-VAD-FMK) inhibits apoptosis by blocking the processing of CPP32. *Biochem. J.* 315: 21–24.
- Stoeger, Z. M., H. Zinger, and E. Mozes. 2003. Beneficial effects of the anti-estrogen tamoxifen on systemic lupus erythematosus of (NZB \times NZW)_{F1} female mice are associated with specific reduction of IgG3 autoantibodies. *Ann. Rheum. Dis.* 62: 341–346.

35. McMurray, R. W. 2001. Estrogen, prolactin, and autoimmunity: actions and interactions. *Int. Immunopharmacol.* 1: 995–1008.
36. Mitchell, D. A., M. C. Pickering, J. Warren, L. Fossati-Jimack, J. Cortes-Hernandez, H. T. Cook, M. Botto, and M. J. Walport. 2002. C1q deficiency and autoimmunity: the effects of genetic background on disease expression. *J. Immunol.* 168: 2538–2543.
37. Cortes-Hernandez, J., L. Fossati-Jimack, F. Petry, M. Loos, S. Izui, M. J. Walport, H. T. Cook, and M. Botto. 2004. Restoration of C1q levels by bone marrow transplantation attenuates autoimmune disease associated with C1q deficiency in mice. *Eur. J. Immunol.* 34: 3713–3722.
38. Vidal, S., D. H. Kono, and A. N. Theofilopoulos. 1998. Loci predisposing to autoimmunity in MRL-Fas *lpr* and C57BL/6-Fas*lpr* mice. *J. Clin. Invest.* 101: 696–702.
39. Abbas, A. K. 2003. The control of T cell activation vs. tolerance. *Autoimmun. Rev.* 2: 115–118.
40. Fossati, L., E. S. Sobel, M. Iwamoto, P. L. Cohen, R. A. Eisenberg, and S. Izui. 1995. The *Yaa* gene-mediated acceleration of murine lupus: *Yaa*[−] T cells from non-autoimmune mice collaborate with *Yaa*⁺ B cells to produce lupus autoantibodies in vivo. *Eur. J. Immunol.* 25: 3412–3417.
41. Izui, S., R. Merino, L. Fossati, and M. Iwamoto. 1994. The role of the *Yaa* gene in lupus syndrome. *Int. Rev. Immunol.* 11: 211–230.
42. Moulton, V. R., N. D. Bushar, D. B. Leiser, D. S. Patke, and D. L. Farber. 2006. Divergent generation of heterogeneous memory CD4 T cells. *J. Immunol.* 177: 869–876.
43. Hu, H., G. Huston, D. Duso, N. Lepak, E. Roman, and S. L. Swain. 2001. CD4⁺ T cell effectors can become memory cells with high efficiency and without further division. *Nat. Immunol.* 2: 705–710.
44. Ben-Porath, I., and R. A. Weinberg. 2004. When cells get stressed: an integrative view of cellular senescence. *J. Clin. Invest.* 113: 8–13.
45. Pearce, E. L., and H. Shen. 2006. Making sense of inflammation, epigenetics, and memory CD8⁺ T-cell differentiation in the context of infection. *Immunol. Rev.* 211: 197–202.
46. Woo, M., R. Hakem, C. Furlonger, A. Hakem, G. S. Duncan, T. Sasaki, D. Bouchard, L. Lu, G. E. Wu, C. J. Paige, and T. W. Mak. 2003. Caspase-3 regulates cell cycle in B cells: a consequence of substrate specificity. *Nat. Immunol.* 4: 1016–1022.

Leukocyte attraction through the CCR5 receptor controls progress from insulinitis to diabetes in non-obese diabetic mice

Carla Carvalho-Pinto¹, María I. García¹, Lucio Gómez¹, André Ballesteros¹, Angel Zaballos¹, Juana M. Flores², Mario Mellado¹, José Miguel Rodríguez-Frade¹, Dimitrios Balomenos¹ and Carlos Martínez-A.¹

¹ Department of Immunology and Oncology, Centro Nacional de Biotecnología/CSIC, UAM Campus de Cantoblanco, Madrid, Spain

² Departamento de Patología Animal II, Facultad de Veterinaria, Universidad de Complutense de Madrid, Madrid, Spain

Lymphocyte infiltration to pancreatic islets is associated to chemoattraction, as are other inflammatory autoimmune processes. We examined whether development of insulinitis and diabetes depends on chemoattraction of lymphocytes via the CCR5 chemokine receptor. In non-obese diabetic (NOD) mice, a substantial fraction of peripheral T cells and virtually all B cells expressed high CCR5 levels. CCR5 expression characterized the effector T cell phenotype, suggesting their potential involvement in disease development. In view of these findings and the CCL5 (RANTES, the CCR5 ligand) expression by pancreatic islets, we treated NOD mice with a neutralizing anti-CCR5 antibody. This did not influence peri-insulinitis advancement, but inhibited β -cell destruction and diabetes. These data demonstrate a role of CCR5-dependent chemoattraction in insulinitis progression to islet destruction, suggesting the potential value of therapeutic intervention by CCR5 targeting.

Key words: Chemokine receptor / Autoimmune disease / Diabetes / NOD mice / CCR5

Received	20/6/03
Revised	7/11/03
Accepted	1/12/03

1 Introduction

The non-obese diabetic (NOD) mouse develops an autoimmune syndrome similar in several aspects to human insulin-dependent diabetes mellitus. In both human and NOD disease, the β -cells of the islets of Langerhans are destroyed by T lymphocytes [1, 2]. Following encounter with islet-specific antigens, activated T lymphocytes migrate to the islets, causing insulinitis. This inflammatory state begins at about 4–5 weeks of age in NOD mice and results in initiation of islet destruction and diabetes at approximately 12 weeks of age [3]. Insulinitis may nonetheless persist for long periods of time without the development of invasive or destructive characteristics. Male NOD mice are an example of non-invasive insulinitis, as are BDC2.5 transgenic mice. The latter mice express a T cell receptor of a diabetogenic T cell clone, in which insulinitis persists for several months before converting to diabetes [4, 5]. Insulinitis progression to diabetes is an

intriguing characteristic of the disease, whose regulation remains undefined.

Insulinitis is characterized by an infiltrate consisting of CD4⁺ and CD8⁺ T cells as well as B cells, although dendritic cells and macrophages also constitute a part of the migrating cells, especially during early disease stages [3]. The cause of infiltrating cell homing to the pancreatic islets is unknown. The chemokines direct recruitment of immune cells to inflammation sites or to autoimmune targets, suggesting that islet expression of chemokines may control inflammatory cell homing and insulinitis. In NOD mice, β -cell expression of CCL2 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1) leads to insulinitis, with a predominance of macrophages but no diabetes [6]. In another study, CCL3 (macrophage inflammatory protein-1 α , MIP-1 α)^{-/-} NOD mice showed reduced incidence of pre-diabetic symptoms at 10 weeks of age [7]. CCR4-expressing T cells were recently shown to participate in insulinitis and diabetes development in NOD mice [8], whereas lack of the CXCR3 chemokine receptor delayed the onset of induced diabetes in a transgenic NOD mouse model [9].

CCR5 expression has also been detected in NOD mouse spleen and islet lymphocytes at the mRNA level, and is

[DOI 10.1002/eji.200324285]

Abbreviations: BrdU: Bromodeoxyuridine PCNA: Proliferating cell nuclear antigen

down-regulated following IL-4 treatment [7, 9]. In the present study, we observed an increase in CCR5-expressing T and B cells in NOD mice, and correlated the expression of this chemokine receptor in T cells with an activated/effector cell phenotype. To examine whether CCR5-dependent migration has an effect on diabetes development, we treated NOD mice with a neutralizing anti-CCR5 antibody. Although this treatment did not affect peri-insulitis development, it reduced incidence of diabetes. These results establish that signaling through CCR5 regulates progression from peri-insulitis to invasive insulitis and diabetes.

2 Results

2.1 Activated T cells in NOD mice express a functional CCR5 receptor

In response to tissue inflammation, chemokine gradients recruit lymphocytes via the chemokine receptors. In NOD mice, lymphocytes invade the pancreatic islets as a result of massive inflammatory infiltration. We examined CCR5 receptor expression levels in T and B lymphocytes of peripheral lymphoid organs in 3-month-old NOD mice. The data show that $28 \pm 3\%$ of $CD4^+$ and $18 \pm 4\%$ of $CD8^+$ splenocytes express high CCR5 levels in NOD mice (Fig. 1); similar CCR5 expression was detected in cervical and pancreatic lymph nodes in these animals. In contrast, expression of this receptor was negligible in control BALB/c mice ($<1\%$ of T cells showed low intensity CCR5 expression; Fig. 1), concurring with a recent report [10]. CCR5 expression by BALB/c mouse B cells was also minimal; surprisingly, however, $95 \pm 6\%$ of NOD mouse B cells expressed this chemokine receptor (Fig. 1). Although T cells from NOD mice transfer disease [11, 12], B cells are also reported to have an important role in diabetes development and probably in antigen presentation in this context [13–15]. Lymphocyte CCR5 expression was similar in 4-month-old NOD mice (not shown). The proportion of $CCR5^+$ lymphocytes had already increased in 4-week-old NOD mice ($11 \pm 1\%$ $CD4^+CCR5^+$ T cells, $9 \pm 2\%$ $CD8^+CCR5^+$ T cells, $52 \pm 8\%$ $CCR5^+$ B cells). This indicates that CCR5 expression is independent of insulitis, as there is no pancreatic infiltrate at this age.

As T cells are the mediators of β -cell destruction, we examined whether CCR5 expression was related to their activation phenotype. We found that $CD4^+CCR5^+$ T cells from 3- or 4-month-old mice express high levels of the CD44 activation/memory marker as well as high CD69 and CD62L levels (Fig. 2 and not shown); they can thus be considered activated. In contrast, $CD4^+CCR5^-$ cells showed lower CD69 and CD62L expression (Fig. 2). A

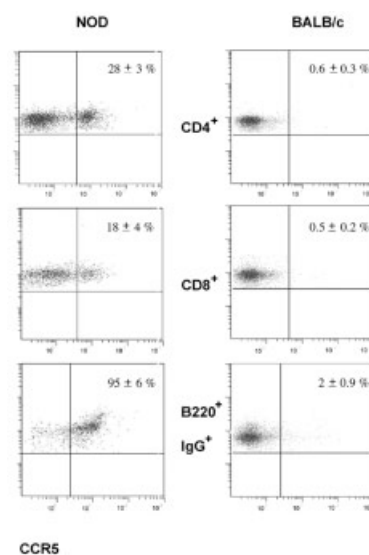


Fig. 1. CCR5 expression by NOD mouse lymphocytes. CCR5 expression of gated $CD4^+$, $CD8^+$ and $B220^+IgG^+$ splenocytes from 3-month-old mice. Flow cytometric profiles correspond to representative mice, and percentages indicate the means \pm SD ($n=4$).

proportion of $CD4^+CCR5^-$ cells expressed high CD44 levels; we considered them resting memory cells, since they expressed neither CD69 nor CD62L (Fig. 2). Bromodeoxyuridine (BrdU) delivery to NOD mice showed that $CCR5^+$ T cells proliferated, whereas the vast majority of $CCR5^-$ cells did not incorporate BrdU (Fig. 2), further confirming the activation status of $CCR5^+$ T cells. Similar results were obtained for $CD8^+CCR5^+$ T cells (not shown).

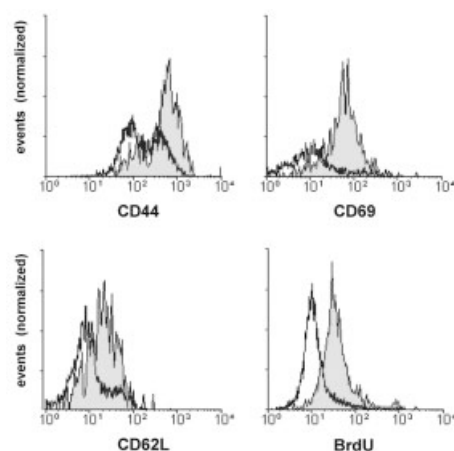


Fig. 2. Activation marker expression by $CD4^+$ T cells in NOD mice. CD44, CD69 and CD62L expression, and BrdU incorporation levels of gated $CD4^+CCR5^+$ (filled histograms) and $CD4^+CCR5^-$ (bold lines) splenocytes from 3-month-old mice following triple-staining analysis. Histograms correspond to representative animals.

The increased CCR5 expression by NOD lymphocytes suggested that leukocyte infiltration to the pancreas may be regulated by a CCL5/CCR5 interaction, and that inhibition of this interaction may have beneficial effects in diabetes. We tested whether mouse lymphocytes migrated in response to CCL5 and whether this response could be inhibited by a mouse anti-CCR5 mAb generated in our laboratory [16]. BALB/c splenocytes migrated only minimally in response to CCL5, whereas those from NOD mice showed a strong response, concurring with their elevated CCR5 expression. The anti-CCR5 mAb inhibited CCL5-mediated NOD splenocyte migration (Fig. 3A, left panel), suggesting its suitability for inhibiting *in vivo* migration of activated CCR5⁺ lymphocytes. The weak chemotactic response of BALB/c splenocytes to

CCL5 was not inhibited by the anti-CCR5 mAb, suggesting that this response is mediated through another CCL5 receptor. CXCL12 (stromal cell-derived factor-1 α , SDF-1 α)-induced migration of BALB/c and NOD splenocytes was not inhibited by the anti-CCR5 mAb, confirming antibody specificity (Fig. 3A, right panel).

To corroborate the anti-CCR5 mAb specificity in blocking CCL5/CCR5 interactions, we tested the migration response of thymocytes previously shown to express CCR5 [17]. Anti-CCR5 mAb treatment specifically blocked thymocyte migration in response to CCL5, but not to CXCL12. Furthermore, migration of cells transfected with CCR6, CCR7, CCR8 or CCR9 was not inhibited by the anti-CCR5 antibody (Fig. 3B).

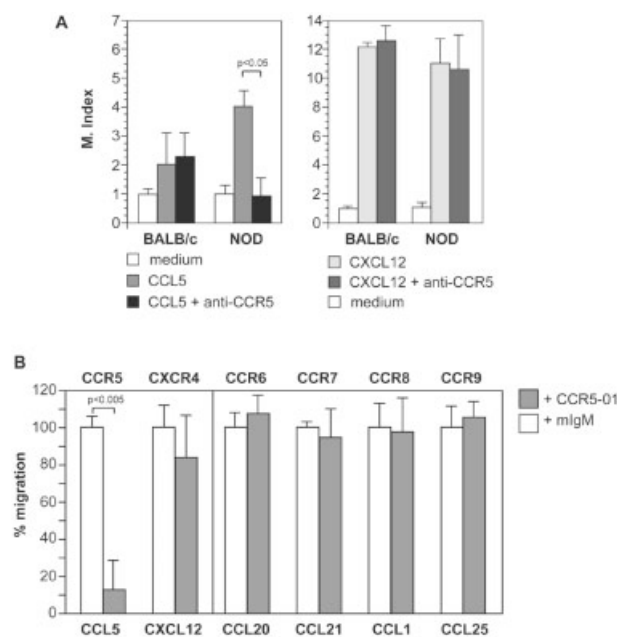


Fig. 3. Anti-human CCR5 mAb blocks mouse CCL5-induced chemotaxis. (A) Splenocytes from NOD, but not from BALB/c mice, migrate in response to mouse CCL5 (10 nM) (left panel), and incubation with anti-CCR5 mAb (CCR5-01; 50 μ g/ml) blocks this response. The mAb has no effect on CXCL12-induced (100 nM) migration of either BALB/c or NOD splenocytes (right panel). (B) CCL5- but not CXCL12-induced migration (10 nM and 100 nM, respectively) of BALB/c thymocytes is specifically blocked by CCR5-01 mAb treatment, while no effect is seen in an isotype-matched control (mIgM) (left). BaF3 cells transfected with the indicated mouse chemokine receptors were allowed to migrate in response to 100 nM of CCL1, CCL20, CCL21 or CCL25 (2 h, 37°C) in the presence of anti-CCR5 or isotype-matched mIgM control (100 μ g/ml) (right). Results are shown as the mean percentages \pm SD of maximum migration in the absence of competitor in triplicate determinations. In all cases, maximum migrated cells represented $\geq 25\%$ of the total cells placed in the upper chamber of the transwells.

2.2 NOD mouse pancreatic islets express CCL5

Chemokine receptor expression is a prerequisite for chemoattraction of lymphocytes, as is adequate chemokine production. To analyze chemokine production by islet cells we used real-time PCR to study CCL5 expression in NOD and BALB/c mouse pancreas. We observed CCL5 expression (Table 1), allowing us to suggest that this chemokine may be involved in the attraction of activated T cells during diabetes onset in NOD mice. Concurring with another report [9], other chemokines expressed in the pancreas included the pro-inflammatory chemokines

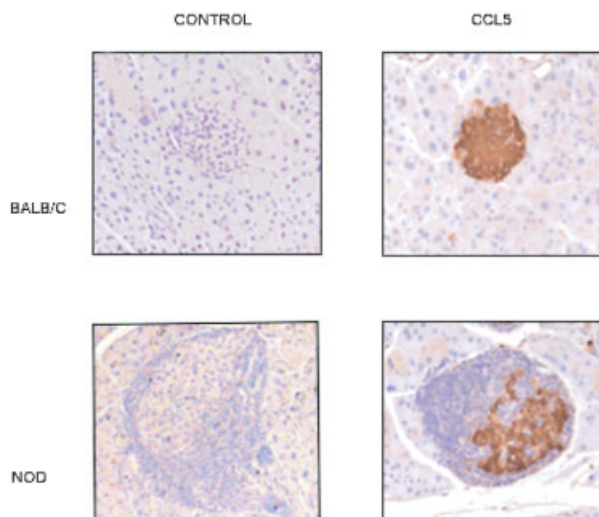


Fig. 4. CCL5 expression in pancreatic islets. CCL5 is highly expressed in BALB/c and NOD pancreatic islets. Chemokine expression was developed following immunostaining of paraffin sections. Controls received the same treatment without addition of primary antibody. Data shown are from one mouse representative of four animals tested. Original magnification 40 \times .

Table 1. Real-time PCR analysis of chemokine expression in NOD and BALB/c mouse pancreas

Chemokine	NOD mice	BALB/c mice
CCL1 (TCA-3/P500)	+	+
CCL2 (MCP-1/JE)	+	–
CCL3 (MIP-1 α)	+	–
CCL4 (MIP-1 β)	–	–
CCL5 (RANTES)	+	+
CCL6 (C10/MRP-1)	+	+
CCL7 (MARC)	–	–
CCL8 (MCP-2)	+	–
CCL9 ((MARP-2/MIP-1 γ))	+	+
CCL10 (CCF18)	+	+
CCL12 (MCP-5)	+	+
CCL17 (TARC)	–	–
CCL19 (MIP-3 β /ELC)	+	+
CCL20 ((MIP-3 α /LARC)	–	–
CCL21 (6CKine/SLC/TCA-4)	+	+
CCL22 (MDC)	+	+
CCL24 (MPIF-2)	+	+
CCL25 (TECK)	–	–
CCL27 (ALP/skinkine)	–	–
CCL28 (MEC)	–	–
CXCL1 (MIP-2/KC)	+	+
CXCL2 ((MIP-2/KC)	+	–
CXCL4 ((PF4)	+	+
CXCL5 (LIX/GCP-2)	+	–
CXCL7 (NAP-2)	–	–
CXCL9 (Mig)	+	+
CXCL10 (IP-10/CRG2)	+	+
CXCL11 (I-TAC)	–	–
CXCL12 (SDF-1)	+	+
CXCL13 (BLC/BCA-1)	+	+
CXCL14 (BRAK)	+	+
CXCL15	–	–
(LungKine/WECH)		
CXCL16 (CXCL16)	+	+
XCL1 (lymphotactin)	+	–
X ₃ CL1 (neurotactin)	+	+

CCL2, CCL8, CXCL9 and CXCL10 (interferon-inducible protein-10, IP-10) (Table 1). Chemokine expression in pancreas was validated by immunohistochemistry. Staining of serial sections with anti-CCL5 or anti-insulin antibodies showed that β -cells produce CCL5 in young (1-month-old) NOD and BALB/c mice (Fig. 4 and not shown). Using appropriate mAb, we also detected CCL2, CXCL10, CXCL2, CX3CL1 and CCL3 expression. Although low levels of CCL2 protein expression were thus detected in both NOD and BALB/c mice, real-time PCR showed CCL2 mRNA only in NOD mice; this discrepancy may be due to differences in technique sensitivity and/or in mRNA and protein stability. The role of these chemokines in the recruitment of inflammatory cells to the pancreas is unclear and should be studied in greater detail.

2.3 CCR5 neutralization inhibits islet destruction but not insulinitis

To characterize the potential role of CCR5 in insulinitis and diabetes development, we treated NOD mice with the neutralizing anti-CCR5 mAb, starting at 2 months of age when insulinitis has already been initiated (not shown and [3]). Mice received a daily injection for 1, 2 or 3 months, and were compared to age-matched control animals. NOD mice treated for 1 month showed an approximately twofold reduction in the degree of lymphocyte invasion in the pancreas compared to untreated mice (Table 2). They nonetheless develop peri-insulitis to the same degree as untreated controls and there was no significant difference in overall relative islet area between treated and untreated animals ($n=6$; Table 2).

Examination of representative lymphocyte populations in 3-month-old (1-month treatment) NOD mice showed no difference between treated and untreated animals. T and B cells were present in similar proportions in treated and untreated animals (Fig. 5); CD4⁺ and CD8⁺ cell levels were comparable, of which CD4⁺ T cells accounted for the majority (Fig. 5). Anti-proliferating cell nuclear antigen (anti-PCNA) staining showed similar proliferation of infiltrating cells in treated and untreated mice (Fig. 5). In addition, the proportion of CCR5-expressing lymphocytes in spleen, cervical and pancreatic lymph nodes was unaltered by anti-CCR5 treatment (not shown), as

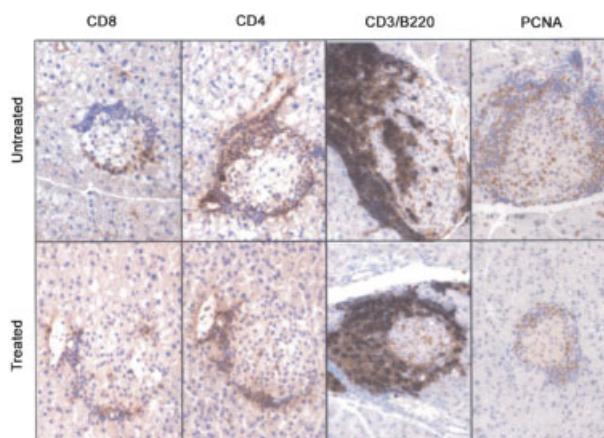


Fig. 5. Anti-CCR5 antibody treatment does not affect the characteristics of the islet infiltrate. Anti-PCNA antibody staining revealed similar proliferation in 3-month-old CCR5-01-treated and -untreated NOD mice. The infiltrate was composed of similar proportions of T and B cells in both treated and untreated animals, as shown by staining with an anti-CD3 (brown) and an anti-B220 antibody (blue-purple). CD4⁺ and CD8⁺ cells were likewise represented within the T cell compartment, irrespective of antibody treatment. Results are representative of three mice tested. Original magnification 40 \times .

Table 2. Degree of insulinitis in anti-CCR5-treated and -untreated NOD mice^{a)}

	3-month-old		4-month-old		5-month-old	
	Treated (1 month)	Untreated	Treated (2 months)	Untreated	Treated (3 months)	Untreated
Peri-insulinitis	2.1 ± 1.9	2.4 ± 2.2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Insulinitis	0.9 ± 0.6 ^{b)}	2.2 ± 0.7 ^{b)}	1.5 ± 0.5 ^{c)}	1.4 ± 0.3 ^{c)}	1.4 ± 0.5 ^{d)}	3.6 ± 0.5 ^{d)}
Relative islet area	5.0 ± 3.2	6.0 ± 2.9	n.d.	n.d.	7.1 ± 3.1 ^{e)}	2.6 ± 2.5 ^{e)}

a) Two-month-old NOD mice were treated with anti-CCR5 antibody until they reached 3, 4 or 5 months of age. Peri-insulinitis, insulinitis and relative overall pancreas area were evaluated as indicate (see Sect. 4) and are represented as the mean ± SD; n.d.: not determined.

b) Treated (*n*=6) vs. untreated (*n*=6), *p*<0.009.

c) Treated (*n*=6) vs. untreated (*n*=6), *p*<0.003.

d) Treated (*n*=6) vs. untreated (*n*=6), *p*<0.003.

e) Treated (*n*=6) vs. untreated (*n*=6), *p*<0.002.

were CD44, CD69 and CD62L expression levels and BrdU incorporation (not shown). We concluded that the anti-CCR5 mAb does not influence the proportion of lymphocytes present in peri-insulinitis, their local proliferation in the islets, or the characteristics of lymphocytes in the periphery.

As for 1-month antibody treatment, a 2- or 3-month treatment period did not affect peripheral or pancreas-migrating lymphocyte characteristics (not shown); 2- and 3-month treatment nonetheless had a drastic effect on insulinitis and diabetes development. Islets of 4- or 5-month-old untreated NOD mice presented lesions, with

islet infiltration evaluated at 2.8 ± 0.3 and 3.6 ± 0.5, respectively, whereas islets from treated animals showed a low degree of infiltration, scored at 1.5 ± 0.5 following a 2-month treatment and 1.4 ± 0.5 following a 3-month treatment (Table 2).

Concurring with the insulinitis data, none of the mice treated for 2 months (4 months old; *n*=10) developed diabetes, whereas four of the ten untreated mice developed disease, as indicated by blood glucose levels (>200 mg/dl). As predicted, disease incidence was higher in 5-month-old untreated NOD mice, as eight of ten mice developed diabetes, while all treated mice (*n*=10) remained healthy. Untreated NOD mice showed a remarkable reduction in relative islet area compared to mAb-treated animals (Table 2). Notably, overall relative islet area was similar in 3- and 5-month-old treated mice, as was the insulinitis score (Table 2). mAb treatment prevented invasive insulinitis and clearly preserved islet production of insulin (Fig. 6). This indicates that antibody delivery protects overall islet area during the critical period of diabetes induction, preserving the functional status of the pancreatic β-cells.

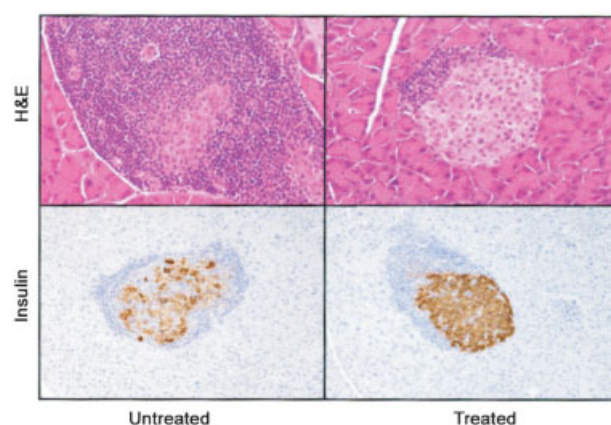


Fig. 6. Anti-CCR5 antibody inhibits islet invasion by infiltrating cells. Upper panels: hematoxylin/eosin staining shows aggressive insulinitis in an islet of an untreated NOD mouse, whereas CCR5-01 treatment leads only to peri-insulinitis. Lower panels: reduced insulin production by islets of untreated vs. treated animals detected with an anti-insulin antibody on paraffin sections. Mice were 4 months old. Original magnification for upper panels 40×, lower panels 20×.

3 Discussion

In this study, we establish a relationship between chemotaxis involving the CCR5 chemokine receptor and the development of insulinitis and diabetes in NOD mice, and show that this receptor regulates critical aspects of the disease. First, a large proportion of NOD mouse lymphocytes express this receptor compared to those from normal mice. Receptor expression correlated with the activated T cell phenotype, indicating that CCR5 expression may be associated with islet antigen-specific T cells. Second, treatment of NOD mice with a neutralizing anti-CCR5 mAb did not affect insulinitis development, but had

a remarkable inhibitory effect on the invasive potential of infiltrating lymphocytes, islet destruction and diabetes development.

The islet inflammatory infiltrate is composed mainly of T and B lymphocytes. We show that a large proportion of CD4⁺ and CD8⁺ cells express the CCR5 chemokine receptor, unlike T cells of normal mice, which show negligible CCR5 expression. Our results show that CCR5⁺ lymphocytes proliferate and express elevated CD44, CD69 and CD62L levels; we thus consider these cells as activated. The activation status of CCR5⁺ T cells and their increased presence in NOD mouse lymphoid organs suggest that these lymphocytes may respond to islet antigens. It appears plausible that autoreactive cells in continuous contact with self antigens are activated and proliferate in NOD mouse peripheral lymphoid organs. The fact that NOD splenocytes are able to transfer disease in NOD-*scid/scid* mice [18] supports this view. Furthermore, our data showing a significant increase in the proportion of CCR5⁺ lymphocytes in 4-week old NOD mice (prior to lymphocyte migration to the pancreas) suggest that self antigen presentation occurs in the periphery. Experiments to test the ability of CCR5⁺ T cells to transfer the disease are under way. T cell activation is thus characterized by increased CCR5 expression, which is associated with diabetes and possibly with other autoimmune diseases. Indeed, CCR5 association is reported in autoimmune diseases such as rheumatoid arthritis [19, 20] and multiple sclerosis, in which an increase in CCR5⁺ cells has been detected [21].

In addition to T cells, which are indispensable for diabetes development [11, 12], B cells contribute to disease progression. Although the exact role of B cell involvement is unclear, it is suggested that the antigen-presenting ability of B cells is critical in NOD-associated T cell activation [13–15] and selection of the diabetogenic T cell repertoire. CCR5 expression is not reported for B cells, but nearly all B cells from NOD mice showed elevated expression of this receptor (Fig. 1). The effect of CCR5 on B cells is not clear, but display of this receptor by B cells may be related to autoimmune disease and to their antigen-presenting activity, a possibility that needs to be tested.

The factors that control the process of insulinitis progression to diabetes in NOD mice have not been described. In addition to loci that influence both insulinitis and diabetes, independent loci have been reported that influence insulinitis without affecting diabetes. Thus, NOD mice congenic for the Idd9 genetic interval have been generated; these animals develop insulinitis, but not diabetes [22]. The role of CCR5 in islet protection has indeed been established, as islet allografts survive significantly longer

in CCR5^{-/-} mice [23]. Our data showing inhibition of diabetes but not of insulinitis after anti-CCR5 treatment of NOD mice suggest that chemotaxis controls the invasive and destructive potential of islet-infiltrating of CCR5⁺ lymphocytes. This potential could in turn be the result of their activation after interaction with islet-produced CCL5, followed by production of inflammatory cytokines.

Indeed, IFN- γ appears to be involved in the transition from insulinitis to β -cell destruction, as its expression coincides with lymphocyte invasion of the islets [24]. Since CCR5 expression is associated with Th1 cell polarization [25], IFN- γ -related mechanisms may contribute to the disease provoked by CCR5⁺ cells. Chemokine receptors including CCR5, as well as Th1 cytokines, were shown to be induced at high levels during islet allograft rejection [26]. Once infiltrating cells are activated, IFN- γ controls CCL9 and CCL10 expression. This was shown in the islets of a mouse diabetes model; these mice lacked CXCR3 (the CCL9/CCL10 receptor) and are resistant to diabetes development [9]. Overall, these findings point to an interrelationship between chemokines and cytokines in diabetes development.

Expression of CCL5 and other chemokines by islets in normal mice may be a mechanism to protect the pancreas from possible infectious agents, due to the ability of the islets to attract activated CCR5⁺ lymphocytes. In the case of NOD mice, we show that CCR5 does not influence lymphocyte homing to the pancreatic islets, but rather controls their invasive potential. It is thus possible that other chemokines may initiate lymphocyte migration. These chemokines could be secreted by β -cells or by activated circulating lymphocytes that reach the pancreas; indeed, we and others have demonstrated production of several chemokines in pancreas [9].

Our data indicate that anti-CCR5 mAb treatment does not allow T cells to invade the islets and exert their deleterious effects. Accordingly, the islet area in post-treatment 5-month-old mouse pancreas is similar to that of 3-month-old treated animals, although the majority of islets in 5-month-old treated mice exhibit peri-insulinitis. An important aspect of our results is that insulinitis was already present when treatment was initiated in 2-month-old animals, indicating that anti-CCR5 treatment produces beneficial effects even after insulinitis has developed. Overall, our findings suggest that CCR5 expression is a characteristic of autoreactive islet-specific effector T cells. We show that chemotaxis through the CCR5 receptor is a crucial control checkpoint in insulinitis progression, which regulates lymphocyte entry into the islet structure, leading to β -cell destruction. On the basis of these results, it can be envisaged that targeting che-

mokine receptors such as CCR5 may lead to design of treatment for diabetes, even after establishment of insulinitis.

4 Materials and methods

4.1 Mice

NOD/Orl Jco mice (CRIFFA, Lyon, France) were maintained in our colony under specific pathogen-free conditions in a barrier zone. Diabetes in our NOD mouse colony is manifested in about 50% of female mice at 16 weeks of age. Mice were considered diabetic when blood glucose levels were >200 mg/dl in two consecutive measurements.

4.2 *In vivo* BrdU administration

Mice were given BrdU (0.8 mg/ml; Sigma, St. Louis, MO) in drinking water, prepared freshly every 2 days, for a 9-day period.

4.3 Flow cytometric analysis

Mononuclear cells of lymphoid organs were triple-stained using a mouse anti-human CCR5 mAb (CCR5–03) generated and characterized in our laboratory [16], and combinations of anti-CD4, -CD8, -B220, -CD44, -CD69, -CD62L, -IgG or -HSA antibodies (all from PharMingen, La Jolla, CA). The CCR5–03 and CCR5–01 mAb were generated using a keyhole limpet hemocyanin-coupled peptide based on amino acids 16–28 of human CCR5 (TSEPCQKINVQIA), which is similar to the mouse homologue (MSAPCQKINVQIA). Stained cells were analyzed on a Coulter Epics XL flow cytometer (Coulter, Miami, FL). BrdU expression was determined by triple staining as described [27] using a FITC-conjugated anti-BrdU antibody (PharMingen).

4.4 Inhibition of cell migration

Migration assays were performed using thymocytes or splenocytes (0.25×10^6 cells in 0.1 ml) from BALB/c or NOD mice. Cells were placed in the upper well of a transmigration chamber (5 μ m pore size; Transwell; Costar, Cambridge, MA). Several concentrations of CCL5 or CXCL12 (0.1–100 nM in 0.6 ml RPMI containing 0.25% BSA; Peprotech, Rocky Hill, NJ) were placed in the lower chamber. Plates were incubated (37°C, 2 h) and cells that had migrated to the lower chamber were counted. Cell migration was calculated as the x-fold increase in migration observed over the medium control. To block chemokine-induced chemotaxis, a mouse anti-CCR5 mAb (CCR5–01; [16]) or isotype-matched mIgM (10–100 μ g/ml) were added simultaneously with cells to the upper chamber.

4.5 PCR analysis

Total cellular RNA was extracted from snap-frozen pancreas of 1-month-old NOD and BALB/c mice using the RNeasy Midi kit (Qiagen, Valencia, CA). Total RNA (5 μ g) was reverse-transcribed using random hexamers and 100 U Superscript II RT (Invitrogen, Carlsbad, CA). Real-time PCR was performed on an ABI Prism 7700 (Applied Biosystems, Foster City, CA), using SYBR Green PCR Core Reagents (Applied Biosystems). Final $MgCl_2$ concentration was 1.5 mM and primers were used at 0.4 μ M. Reactions were incubated 2 min at 50°C, 10 min at 95°C, followed by 40 cycles of 15 s at 95°C, and 90 s at 67°C. Specific primers, designed with PrimerExpress software (Applied Biosystems), amplified sequences spanning different exons, except for the 28S rRNA pair. Differences in cDNA load were corrected for the amount of amplified 28S rRNA. mRNA expression is shown as threshold cycle values (Ct), defined as the cycle at which fluorescence exceeds ten times the standard deviation (SD) of the mean baseline emission for the early cycles. Expression was considered positive when Ct values were below 33 cycles, and negative when Ct values were higher than 33 cycles.

Primers used are shown in Table 3.

4.6 Mouse treatment

Eight-week-old NOD mice received daily intraperitoneal injections of anti-CCR (CCR5–01) mAb (100 μ g in 200 μ l PBS) for a 1- or 2-month period. Control animals received 200 μ l of isotype-control antibody.

4.7 Histopathology

Pancreatic tissue was fixed in 5% formalin and 4- μ m sections were used for staining. Insulinitis was determined following hematoxylin/eosin staining. Islets from three to four non-contiguous sections were examined for peri-insulinitis and insulinitis development. For 3-month-old mice, at least 35 islets were evaluated per mouse; due to the reduced number of islets in 4-month-old mice, a minimum of 20 islets was examined. Insulinitis was evaluated in a blind manner as 0, normal; 1, <10% infiltration in the islet structure; 2, 10–25% infiltration; 3, 25–50% infiltration; 4, >50% infiltration and/or severe islet damage. Peri-insulinitis was determined as the proportion of the total mononuclear cells surrounding the islet relative to islet size and scored as 0, no infiltrate; 1, <10% infiltration; 2, 10–25% infiltration; 3, 25–50% infiltration; 4, >50% infiltration. For peri-insulinitis and insulinitis, at least 20–35 random islets were scored for each organ and the average value was determined. Relative islet area was determined as the islet:pancreas ratio, once total islet and pancreas areas had been determined in each section using BioQuant Image Analyzer (R&M Biometrics).

Table 3. Primers used in this study

	Sense	Antisense
mCCL1	TGCCGTGTGGATACAGGATGT	TCAAGGTGTTCAAGCAGCAGC
mCCL2	TCTGGGCCTGCTGTTCACA	TTGGGATCATCTTGCTGGTG
mCCL3	CACCACTGCCCTTGCTGTT	AGGAGAAGCAGCAGGCAGTC
mCCL4	GCTCCAAGCCAGCTGTGGTA	CGCTGGAGCTGCTCAGTTC
mCCL5	TGCCACGTCAAGGAGTATT	TCTCTGGGTGGCACACACTT
mCCL6	TTGTGGCTGTCCTTGGGTC	AGTGTCTTGAAAGCCTTGATGAATT
mCCL7	TCAGCATCCAAGTGTGGGC	CAGGGACACCGACTACTGGTG
mCCL8	TCCCTGTCAGCCAGAGAAG	GCTTTTCAGCACCCGAAGG
mCCL9	TGCCCTCTCCTTCCTCATTCT	GCTGTGCCTTCAGACTGCTCT
mCCL11	GCTGGCTCACCCAGGCT	TGTTGGTGATTCTTTTCTAGCTCTTC
mCCL12	GCTACCACCATCAGTCTCAGG	CTTCCGGACGTGAATCTTCTG
mCCL17	CAGGGATGCCATCGTGTTTC	GGCCTTGGGTTTTACCA
mCCL19	TGGTCTCTGGACCTTCCCA	CACGATGTTCCAGGGATG
mCCL20	CTGCTGGCTCACCTCTGCA	CATCGGCCATCTGTCTGTG
mCCL21	GGGAAACAAAGCCCCGG	GCTGTGTCTGTTCAGTTCTCTTG
mCCL22	CACCCTCTGCCATCACGTTT	CCTGGGATCGGCACAGATAT
mCCL24	TGGTTAGCTACCAGTTGGCCA	TGAACCCACAGCAGCTTGG
mCCL25	AAGGTGCCCTTGAAGACTGC	TGGCGGAAGTAGAATCTCACAG
mCCL27	CGGCTCTGAAGCAGCCTTGCCCT	CCATGTGGACAATCCTCCTCA
mCCL28	GTTCATGCAGCATCCAGAGAG	CTTCAAAGTACGATTGTGCGG
mCX3CL1	CCGCGTTCTTCCATTTGTGT	AAGCCACTGGGATTCGTGAG
mXCL1	CTTTCCTGGGAGTCTGCTGC	CAGCCGCTGGGTTTGTAAGT
mCXCL1	CCTTGACCCTGAAGCTCCCT	CGGTGCCATCAGAGCAGTCT
mCXCL2	CCAAACCGAAGTCATAGCCAC	CACCTTTTAGCATCTTTGGACAA
mCXCL4	TGAAGACCATCTCCTCTGGGA	TTCTTCAGGGTGGCTATGAGC
mCXCL5	TGGATCCAGAAGCTCCTGTGA	ACTGGCCGTCTTTCCACTG
mCXCL7	CCATCTCTGGAATCCCATTCA	TCCATTCTTCAGTGTGGCTATCAC
mCXCL9	TCTGCCATGAAGTCCGCTG	CAGGAGCATCGTGCATTCT
mCXCL10	TGCTGGGTCTGAGTGGGACT	CCCTATGGCCCTCATTCTCAC
mCXCL11	GGCTGCTGAGATGAACAGGAA	AAAGACAGCGCCCTGTTT
mCXCL12	AGCCACGTCAAGCATCTGA	TCGGGTCAATGCACACTGT
mCXCL13	GATTCAAGTTACGCCCCCTG	ACCATTTGGCACGAGGATTC
mCXCL14	ATAGCGACGTGAAGAAGCTGG	GGTACCTGGACATGCTCTTGGT
mCXCL15	TTCGAGACCATTACTGCAACAG	ACAGTAGCCTTCACCCATGGA
mCXCL16	GTGGGTCCGTGAAGTGTGGA	GGGTACTGGCTTGAGGCAAAT
28S	TGCCATGGTAATCCTGCTCA	CCTCAGCCAAGCACATACACC

4.8 Immunostaining

For paraffin sections, pancreatic tissue was fixed in 5% formalin, 4- μ m sections were deparaffinized and treated with 3% H₂O₂ in 70% methanol, followed by microwave treatment in 10 mM sodium citrate buffer. CCL5, CCL2, CXCL10, CX3CL1, CCL3 and CXCL2 were detected using goat anti-mouse antibodies (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), followed by peroxidase (PO)-conjugated donkey anti-sheep/goat antibody (The Binding Site, Birmingham, GB). Insulin was identified using a guinea pig anti-insulin anti-

body, followed by PO-rabbit anti-guinea pig antibody (both from Dako, Glostrup, Denmark). PO-anti-PCNA (Santa Cruz) was used to stain paraffin sections according to manufacturer's instructions. Double staining for B220 and CD3 was performed using biotinylated rat anti-mouse B220 antibody (Southern Biotechnology, Birmingham, AL) and rabbit anti-human CD3 (Dako), followed by alkaline phosphatase-streptavidin and PO-conjugated goat anti-rabbit antibody (Dako).

Pancreas cryostat sections (6–8 µm) were fixed in chilled acetone and stained with biotin-anti-CD4 and -CD8 antibodies (Caltag, Burlingame, CA). Endogenous PO activity was blocked by incubation in PBS containing 0.03% H₂O₂. For staining with biotin-conjugated antibodies, sections were incubated with a biotin blocking kit (Dako). Biotinylated antibodies were developed with the StrepABComplex/HRP kit (Dako); PO activity was detected using FAST DAB (Sigma).

4.9 Statistics

The Mann-Whitney U-test was used for statistical analysis and significance was attributed for $p < 0.05$.

Acknowledgements: We thank L. Kremer for transfected Baf 3 cells, M. C. Moreno-Ortiz for help with flow cytometric analysis, J. M. Caballero for help with animal work and C. Mark for editorial assistance. D.B. is the recipient of a Ramón y Cajal grant. C.E.C.-P. is supported by predoctoral fellowship BEX1499/98-0 from the Brazilian CAPES Foundation. This work was supported in part by the US-Spain Science & Technology Program grant No. 98149 and the Spanish CICyT/FEDER. The Department of Immunology and Oncology was founded and is supported by the Spanish Council for Scientific Research (CSIC) and by Pfizer.

References

- 1 Bach, J. F., Insulin-dependent diabetes mellitus as an autoimmune disease. *Endocr. Rev.* 1994. **15**: 516–542.
- 2 Tisch, R. and McDewitt, H., Insulin-dependent diabetes mellitus. *Cell* 1996. **85**: 291–297.
- 3 Bach, J. F. and Mathis, D., The NOD mouse. *Res. Immunol.* 1997. **148**: 285–286.
- 4 André, I., Gonzalez, A., Wang, B., Katz, J., Benoist, C. and Mathis, D., Checkpoints in the progression of autoimmune disease: lessons from diabetes models. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996. **93**: 2260–2263.
- 5 Katz, J. D., Wang, B., Haskins, K., Benoist, C. and Mathis, D., Following a diabetogenic cell from genesis through pathogenesis. *Cell* 1993. **74**: 1089–1100.
- 6 Grewal, I. S., Rutledge, B. J., Fiorillo, J. A., Gu, L., Gladue, R. P., Flavell, R. A. and Rollins, B. J., Transgenic monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in pancreatic islets produces monocyte-rich insulinitis without diabetes. *J. Immunol.* 1997. **159**: 401–408.
- 7 Cameron, M. J., Arreaza, G. A., Grattan, M., Meagher, C., Sharif, S., Burdick, M. D., Strieter, R. M., Cook, D. N. and Delovitch, T. L., Differential expression of CC chemokines and CCR5 receptor in the pancreas is associated with progression to type I diabetes. *J. Immunol.* 2000. **165**: 1102–1110.
- 8 Kim, S. H., Cleary, M. M., Fox, H. S., Chantry, D. and Sarvetnick, N., CCR4-bearing T cells participate in autoimmune diabetes. *J. Clin. Invest.* 2002. **110**: 1675–1686.
- 9 Frigerio, S., Junt, T., Lu, B., Gerard, C., Zumsteg, U., Hollander, G. A. and Piali, L., Beta cells are responsible for CXCR3-mediated T cell infiltration in insulinitis. *Nat. Med.* 2002. **8**: 1414–1420.
- 10 Mack, M., Cihak, J., Simonis, C., Luckow, B., Proudfoot, A. E., Plachy, J., Bruhl, H., Frink, M., Anders, H. J., Vielhauer, V., Pfisteringer, J., Stangassinger, M. and Schlondorff, D., Expression and characterization of the chemokine receptors CCR2 and CCR5 in mice. *J. Immunol.* 2001. **166**: 4697–4704.
- 11 Bach, J. F. and Chatenoud, L., Tolerance to islet autoantigens in type 1 diabetes. *Annu. Rev. Immunol.* 2001. **19**: 131–161.
- 12 Wang, B., Gonzalez, A., Benoist, C. and Mathis, D., The role of CD8⁺ T cells in the initiation of insulin-dependent diabetes mellitus. *Eur. J. Immunol.* 1996. **26**: 1762–1769.
- 13 Serreze, D. V., Fleming, S. A., Chapman, H. D., Richard, S. D., Leiter, E. H. and Tisch, R. M., B lymphocytes are critical antigen-presenting cells for the initiation of T cell-mediated autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J. Immunol.* 1998. **161**: 3912–3918.
- 14 Noorchashm, H., Moore, D. J., Noto, L. E., Noorchashm, N., Reed, A. J., Reed, A. L., Song, H. K., Mozaffari, R., Jevnikar, A. M., Barker, C. F. and Naji, A., Impaired CD4⁺ T cell activation due to reliance upon B cell-mediated costimulation in nonobese diabetic (NOD) mice. *J. Immunol.* 2000. **165**: 4685–4696.
- 15 Chiu, P. P. L., Serreze, D. V. and Danska, J. S., Development and function of diabetogenic T cells in B cell-deficient nonobese diabetic mice. *Diabetes* 2001. **50**: 763–770.
- 16 Rodríguez-Frade, J. M., Vila-Coro, A. J., Martín, A., Nieto, M., Sánchez-Madrid, F., Proudfoot, A. E. I., Wells, T. N. C., Martínez-A., C. and Mellado, M., Similarities and differences in RANTES- and (AOP)-RANTES-triggered signals: implications for chemotaxis. *J. Cell Biol.* 1999. **144**: 755–765.
- 17 Bleul, C. C., Wu, L., Hoxie, J. A., Springer, T. A. and Mackay, C. R., The HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 are differentially expressed and regulated on human T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997. **94**: 1925–1930.
- 18 Rohane, P. W., Shimada, A., Kim, D. T., Edwards, C. T., Charlton, B., Shultz, L. D. and Fathman, C. G., Islet-infiltrating lymphocytes from prediabetic NOD mice rapidly transfer diabetes to NOD-scid/scid mice. *Diabetes* 1995. **44**: 550–554.
- 19 Gomez-Reino, J. J., Pablos, J. L., Carreira, P. E., Santiago, B., Serrano, L., Vicario, J. L., Balsa, A., Figueroa, M. and de Juan, M. D., Association of rheumatoid arthritis with a functional chemokine receptor, CCR5. *Arthritis Rheum.* 1999. **42**: 989–992.
- 20 Mack, M., Bruhl, H., Gruber, R., Jaeger, C., Cihak, J., Eiter, V., Plachy, J., Stangassinger, M., Uhlig, K., Schattenkirchner, M. and Schlondorff, D., Predominance of mononuclear cells expressing the chemokine receptor CCR5 in synovial effusions of patients with different forms of arthritis. *Arthritis Rheum.* 1999. **42**: 981–988.
- 21 Balashov, K. E., Rottman, J. B., Weiner, H. L. and Hancock, W. W., CCR5⁽⁺⁾ and CXCR3⁽⁺⁾ T cells are increased in multiple sclerosis and their ligands MIP-1α and IP-10 are expressed in demyelinating brain lesions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999. **96**: 6873–6878.
- 22 Lyons, P. A., Hancock, W. W., Denny, P., Lord, C. J., Hill, N. J., Armitage, N., Siegmund, T., Todd, J. A., Phillips, M. S., Hess, J. F., Chen, S. L., Fischer, P. A., Peterson, L. B. and Wicker, L. S., The NOD Idd9 genetic interval influences the pathogenicity of insulinitis and contains molecular variants of Cd30, Tnfr2, and Cd137. *Immunity* 2000. **13**: 107–115.
- 23 Abdi, R., Smith, R. N., Makhlof, L., Najafian, N., Luster, A. D., Auchincloss, H., Jr. and Sayegh, M. H., The role of CC chemokine receptor 5 (CCR5) in islet allograft rejection. *Diabetes* 2002. **51**: 2489–2495.

- 24 **André-Schmutz, I., Hindelang, C., Benoist, C. and Mathis, D.,** Cellular and molecular changes accompanying the progression from insulinitis to diabetes. *Eur. J. Immunol.* 1999. **29**: 245–255.
- 25 **Loetscher, P., Uguccioni, M., Bordoli, L., Baggiolini, M., Moser, B., Chizzolini, C. and Dayer, J. M.,** CCR5 is characteristic of Th1 lymphocytes. *Nature* 1998. **391**: 344–345.
- 26 **Abdi, R., Means, T. K. and Luster, A. D.,** Chemokines in islet allograft rejection. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 2003. **19**: 186–190.
- 27 **Balomenos, D., Rumold, R. and Theofilopoulos, A. N.,** Interferon- γ is required for lupus-like disease and lymphoaccumulation. *J. Clin. Invest.* 1998. **101**: 364–371.

Correspondence: Carlos Martinez-A., Department of Immunology and Oncology, Centro Nacional de Biotecnología/CSIC, Campus de Cantoblanco, Universidad Autónoma, E-28049 Madrid, Spain
Fax: +34-91-372-0493
e-mail: cmartineza@cnb.uam.es



AGRADECIMIENTOS

Durante casi cinco años he navegado en este buque capeando tempestades y calmas interminables, ahora el viaje llega a su fin. Este es el último suspiro en el cuaderno de bitácora de esta Tesis que ya termina. He llegado a puerto y al volver la vista atrás me persiguen buenos y malos momentos, días sin noche y noches sin Luna.

Este es mi testamento de ausencias, el epílogo de una etapa de mi vida que ya acaba y que con el paso de los días, meses y años, todos habéis moldeado poco a poco, dejando una huella imborrable en mi. Podría sembrar de interminables agradecimientos el papel y enumerar nombres, motivos, lugares y fechas, pero sólo lo que recuerdo de cada uno de vosotros y el sabor de cada instante es fiel a la verdad. Gracias a todos los que me acompañaron en el descubrimiento de un Madrid extraño y sin mar. A los miembros del DIO, grumetes, marineros y captinanes, gracias a todos los que con el esfuerzo diario habéis hecho posible este momento, por las innumerables horas compartidas, por las cenas, las comidas y la compañía, gracias más allá de las palabras, gracias por poder contar conmigo para charlar, reír y darle vueltas al mundo mientras el mundo espera, gracias por las miradas, las palabras de apoyo y por todos y cada uno de los días. Gracias al Doctor Dimitrios Balomenos por darme la la oportunidad y los medios para poder realizar esta Tesis.

Gracias Ruth, a ti te debo la certeza de encontrarme cada mañana con una sonrisa, la seguridad de un café tranquilo, la compañía en silencio, las charlas y todo lo que das sin pedir nada a cambio, gracias por tu generosidad inapelable. Gracias Cris, por que aún cuando las tormentas agitaban furiosas nuestro barco, tu estabas al otro lado de mi mano, siempre dispuesta a aferrarla para no salir volando.

Gracias Dani por estar al otro lado de la puerta, por convertirte en mi amigo, por compartir y escuchar, por tu sonrisa siempre abierta. Gracias Ali, Álvaro y Nerea, por las cenas y la compañía.

Gracias Mamá, para ti no hay palabras. Gracias por el apoyo, la constante fe en mi y tu amor incondicional. Eres para mi un ejemplo de superación y valentía. Todo lo que me has enseñado me ha hecho como soy, todo lo que soy parte de ti. Al verme en el espejo, tu reflejo entremezclado con el mío me da fuerza cada mañana. Es un orgullo ser tu hijo. Gracias abuela, siempre has sido un pilar fundamental en mi vida, la forma en que me miras me hace sentir que puedo llegar allí donde nunca soñé ir.

Rebeca, esta Tesis y lo que conlleva es tan tuya como mía. A ti te debo los años más felices de mi vida, tu compañía, tu generosidad, tu dulzura y todo lo que jamás podré agradecerte han dejado una huella imborrable en mi pecho. Hacemos un buen equipo, siempre estaré a tu lado, en la tormenta y en la calma. Sin tu ayuda nada hubiera sido posible, te veré siempre en cada rincón oscuro, “porque mi cuerpo es testigo de tu cuerpo, y mi alma a tu alma está clavada”.

Finalizada ya la singladura y recogidas las velas en cubierta, mi alma marinera sueña ya con otros mares, con un nuevo destino para mi insaciable tendencia bucanera. Pero en mi viaje no estaré solo, más allá de este último punto final se esconden cientos de puertos por descubrir, miles de noches, cientos de batallas por librar, millones de besos y todos llevan tu nombre escrito a fuego en la solapa, Bea, tuyo es mi horizonte y mi destino, tus ojos marcarán el rumbo a seguir, las huellas de tus pasos en la arena serán mi único camino, tu sombra será mi luz, juntos descubriremos quienes somos. Te quiero.

A Todos Gracias

